

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología Animal II



TESIS DOCTORAL

**Susceptibilidad a esclerosis múltiple en población española :
factores genéticos no HLA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ana Mas Fontao

DIRECTORES:

Alfonso Martínez Arias
Elena Urcelay García

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5325644606

T616.8-004

MAS

SUS

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA ANIMAL II



SUSCEPTIBILIDAD A ESCLEROSIS MÚLTIPLE

EN POBLACIÓN ESPAÑOLA: FACTORES

GENÉTICOS NO HLA



236330735

Memoria presentada por Dña. Ana Mas Fontao para optar al grado de Doctor en

Inmunología.

Madrid, Septiembre de 2007

Esta tesis se ha realizado gracias a la beca concedida por la Fundación Alfonso Martín Escudero y a los proyectos del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) PI04/0991 titulado “*Genética de la Esclerosis Múltiple: Correlación con los Fenotipos Clínicos y Tratamiento*” y CP04/00175 titulado “*Inmunogenética Avanzada de la Esclerosis Múltiple en la población Española*”, en el Servicio de Inmunología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y en colaboración con el Servicio de Neurología (Unidad de Enfermedades Desmielinizantes) y el Laboratorio de Esclerosis Múltiple del mismo centro. La reprografía ha sido financiada por la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Dedicada a mis padres.

A Celia y a Sebastián.

A los que me quieren.

*La mente es el hilo que une cuerpo y alma y domina
todo nuestro ser. Cuando el hilo se rompe, el cuerpo se
convierte en polvo, pero el alma perdura por siempre.*

Anónimo

Me gustaría expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Gómez de la Concha, porque me brindó la oportunidad de unirme a su grupo cuando no había terminado aún de estudiar y permitió que después me quedase con ellos todo este tiempo.

A mis directores de tesis, el Dr. Alfonso Martínez y la Dra. Elena Urcelay, por darme a conocer una pequeña parte de esta compleja ciencia que es la inmunología y animarme a que siga aprendiendo sobre ella. Por estar siempre dispuestos a escucharme y a contarme. Por dedicarme estos años.

Al Dr. Fdez Arquero, a Carmen Martínez y a mis compañeros de laboratorio, por enseñarme, ocuparse de mis muestras, ayudarme con las bases o quitar esa placa del 7900 que nunca termina. Al equipo de Neurología, especialmente al Dr. Arroyo, a Roberto, a Manuel y a Virginia, por su tantas veces inestimable ayuda.

A mis amigos: Ana, Bárbara, Carlos, José Luis, Manmen, Maricarmen, Miguel, Nadia y Raquel por las tardes con risas (y llantos) en el trabajo y fuera de él, que me ayudaron a ser más feliz y a no tirar la toalla.

A Conchi, por sus conocimientos científicos; por ser un modelo a seguir en el trabajo bien hecho y sobre todo, por su paciencia y amistad; y a Alfonso, por ser, antes que nada, amigo, y escucharme, aconsejarme y enseñarme siempre que lo he necesitado.

Por último y más importante, a mi familia: mis abuelos, los que están conmigo o en mi recuerdo, siempre orgullosos; a mis padres, mi hermana Celia y mi hermano Sebastián (y Esther), que siempre están ahí y confían en mí. Sois todo para mí.

Muchísimas gracias a todos.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- ACTH:** *Adrenocorticotropic Hormone* (Hormona Adrenocorticotropa)
- AH:** *Ancestral Haplotype* (Haplotipo Ancestral)
- AR:** Artritis Reumatoide
- BCR:** *B-Cell Receptor* (Receptor de Células B)
- BH₄:** Tetrahidrobiopterina
- CAIA:** *Collagen Antibody-Induced Arthritis* (Artritis Inducida por Anticuerpos frente a Colágeno)
- cGMP:** guanosín monofosfato cíclico
- CI:** *Confidence Interval* (Intervalo de Confianza)
- CIITA:** *Class II Transactivator* (Proteína activadora de la transcripción de Clase II)
- CD:** *Cluster of Differentiation* (Agrupación de diferenciación)
- CMV:** Citomegalovirus
- CU:** Colitis Ulcerosa
- DE:** Desviación Estándar
- DNA:** *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
- DO:** Densidad Óptica
- dUTP:** 2′ deoxiuridina 5′ trifosfato
- EAE:** *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (Encefalomielitis Experimental Autoinmune)
- EBF:** *Early B-cell Factor* (Factor temprano de linfocitos B)
- EBV:** Epstein-Barr Virus
- EC:** Enfermedad Celiaca
- EDSS:** *Expanded Disability Status Scale* (Escala de Discapacidad Expandida)
- EII:** Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn)
- EM:** Esclerosis Múltiple
- EM (algoritmo):** Expectación-Maximización
- EM-PP:** Esclerosis Múltiple Primaria-Progresiva
- EM-PR:** Esclerosis Múltiple Primaria-Recurrente
- EM-RR:** Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente
- EM-SP:** Esclerosis Múltiple Secundaria-Progresiva
- eNOS:** *endothelial Nitric Oxide Synthase* (Oxido Nítrico Sintasa endotelial)
- Eta-1:** *Early T-cell activation gene-1* (Gen de Activación Temprana de Linfocitos T -1)

FAD: Flavín Adenín Dinucleótido

Fc: Fragmento Cristalizable (Inmunoglobulinas)

FcR: Receptor para Fc

FcRL: *Fc Receptor Like* (Homólogo del Receptor para Fc)

FcγR: Receptor del Fragmento Cristalizable de las Inmunoglobulinas G

FcRγ: Cadena gamma de los Receptores de los Fragmentos Cristalizables de las Igs.

FMN: Flavín mononucleótido

GA: *Glatiramer Acetate* (Acetato de Glatiramer)

HHV-6: *Human Herpesvirus 6* (Herpesvirus 6 Humano)

HIV: *Human Immunodeficiency Virus* (Virus de la Inmunodeficiencia Humano)

HLA: *Human Leukocyte Antigen* (Antígeno Leucocitario Humano)

HLH: *Helix-Loop-Helix* (Estructura en Hélice-Bucle-Hélice)

HMG-CoA: HidroxiMetilGlutaril Coenzima A

IFN-β: Interferón beta

IFN-γ: Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

Ii: Cadena Invariante

IL: Interleuquina

IL4R: Receptor de la IL4

iNOS: *inducible Nitric Oxide Syntase* (Oxido Nítrico Sintasa Inducible)

ITAM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs* (inmunorreceptor con Motivos de Activación basados en Tirosinas)

ITIM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs* (inmunorreceptor con Motivos de Inhibición basados en Tirosinas)

JAK: *Janus Kinase* (Kinasa Janus)

Kb: Kilobase

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LD: *Linkage Disequilibrium* (Desequilibrio de Ligamiento)

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LPS: Lipopolisacárido

LT-A: *Lymphotoxin A* (Linfotoxina A)

LT-B: *Lymphotoxin B* (Linfotoxina B)

MAPT: *Microtubule Associated Protein* TAU (Proteína Asociada a Microtúbulos TAU)

Mb: Megabase

MBP: *Myelin Basic Protein* (Proteína Básica de la Mielina)

MGB: *Minor Groove Binder* (de unión al surco menor del DNA)

MHC: *Major Histocompatibility Complex* (Complejo Mayor o Principal de Histocompatibilidad)

MHC2TA: *MHC class II Transactivator* (Activador de la Transcripción de Moléculas de MHC de clase II)

MIF: *Macrophage Inhibitory Migration Factor* (Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos)

MRI: *Magnetic Resonance Imaging* (Imagen de Resonancia Magnética)

NADP(H): Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato

NF- κ B: *Nuclear Factor κ B* (Factor Nuclear κ B)

NK: Linfocito *Natural Killer* (linfocito citolítico natural)

NKT: Linfocito T *Natural Killer* (linfocito T citolítico natural)

nNOS: *neuronal Nitric Oxide Syntase* (Oxido Nítrico Sintasa neuronal)

NOS2A: *Nitric Oxide Synthase 2A* (Oxido Nítrico Sintasa 2A)

NO: *Nitric Oxide* (Oxido Nítrico)

OCTN: *Organic Cation Transporter* (Transportador de Cationes Orgánicos)

OPN: Osteopontina

OR: Odds Ratio

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PCR-SSOP: *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotid Probe* (PCR con sondas específicas de secuencia)

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismos de un Único Nucleótido)

STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription* (Transductores de Señal y Activadores de la Transcripción)

TAC: Tomografía Axial Computerizada

TDT: Test de Desequilibrio de Transmisión

TEC: *Thymic Epitelial Cells* (Células Epiteliales Tímicas)

TGF- β : *Transforming Growth Factor Beta* (Factor de Crecimiento Tumoral Beta)

Th: Linfocito T *helper*

Tm: T *melting* (Temperatura de desnaturalización)

TNF: *Tumour Necrosis Factor* (Factor de Necrosis Tumoral)

VIP: *Vasoactive Intestinal Peptide* (Péptido Intestinal Vasoactivo)

VLA-4: *Very Late Antigen-4*

VNTR: *Variable Number of Tandem Repeats* (Repeticiones en tandem de número variable de veces)

γ_c : cadena gamma común

ÍNDICE

INDICE

INTRODUCCIÓN	9
▪ Definición y Características de la Esclerosis múltiple	10
▪ Prevalencia de la Esclerosis Múltiple	12
▪ Formas Clínicas de la Esclerosis Múltiple	13
▪ Modelo Animal de la Esclerosis Múltiple	15
▪ Diagnóstico de la Esclerosis Múltiple	17
▪ Tratamiento de la Esclerosis Múltiple	18
▪ Etiología de la Esclerosis Múltiple	20
Factores ambientales	21
Factores genéticos	22
Complejo Mayor de Histocompatibilidad	23
MHC de Clase II	25
MHC de Clase I	27
MHC de Clase III	28
▪ Genética de la Esclerosis Múltiple	31
Estudio de genes candidatos	32
1. <i>MHC2TA</i>	34
2. <i>MHC2TA</i> y su relación con infección viral por HHV-6A	38
3. <i>EBF1</i> (<i>Early B-cell Factor</i>)	40
4. <i>FcRL3</i> (<i>Fc Receptor Like-3</i>)	42
5. Interleuquina 4 (<i>IL4</i>)	46
6. Interferón-gamma (<i>IFNG</i>)	47
Relación con Tratamiento con IFN- β	50
7. Osteopontina (<i>OPN</i>)	51
8. Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (<i>MIF</i>)	53
9. Oxido Nítrico Sintasa Inducible (<i>NOS2A</i>)	56
OBJETIVOS	59

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS	61
▪ Enfermos de Esclerosis Múltiple	62
▪ Controles	63
▪ Preparación de las Muestras	63
Obtención de DNA a partir de las muestras	63
Cuantificación del DNA y estimación de su pureza	64
▪ Tipaje del HLA	64
Tipaje de los genes de HLA de clase II: <i>DRB1</i> , <i>DQA1</i> y <i>DQB1</i>	64
Subtipaje del alelo <i>DR2</i>	65
▪ Tipaje de los genes fuera del HLA	66
Análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNP)	66
Análisis de los microsatélites y VNTR	69
Detección de HHV-6A	74
Polimorfismos estudiados en los genes candidatos	75
▪ Estudios Realizados	79
Estudio Caso-Control	79
Estudio o Test de Desequilibrio de Transmisión (TDT)	79
Estudio de Haplotipos	82
Análisis Estadístico	82
 RESULTADOS	 83
1. <i>MHC2TA</i>	84
2. <i>MHC2TA</i> y su relación con infección viral por HHV-6A	87
3. <i>EBF1</i> (<i>Early B-cell Factor 1</i>)	90
4. <i>FcRL3</i> (<i>Fc Receptor Like-3</i>)	94
5. Interleuquina 4 (<i>IL4</i>)	96
6. Interferón-gamma (<i>IFNG</i>)	99
Relación con Tratamiento con IFN- β	100
7. Osteopontina (<i>OPN</i>)	103
8. Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (<i>MIF</i>)	105
9. Oxido Nítrico Sintasa Inducible (<i>NOS2A</i>)	109

DISCUSIÓN **116**

1. *MHC2TA* 117
2. *MHC2TA* y su relación con infección viral por HHV-6A 120
3. *EBF1* (*Early B-cell Factor 1*) 123
4. *FcRL3* (*Fc Receptor Like-3*) 125
5. Interleuquina 4 (*IL4*) 128
6. Interferón-gamma (*IFNG*) 132
7. Osteopontina (*OPN*) 134
8. Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (*MIF*) 136
9. Oxido Nítrico Sintasa Inducible (*NOS2A*) 138

CONCLUSIONES **141****BIBLIOGRAFÍA** **144**

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

▪ DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica inflamatoria que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC) y al nervio óptico. En ella se produce una destrucción de las vainas de mielina que recubren los axones de las neuronas, lo que se traduce en alteraciones de uno o más sistemas funcionales en los individuos afectados. La causa exacta de la enfermedad a día de hoy se desconoce; sin embargo, los avances en el conocimiento de los eventos moleculares que tienen lugar en esta patología han sido espectaculares en los últimos años, lo que arroja nuevas pistas sobre la etiología y permite dirigir los pasos hacia determinadas vías de investigación. La Esclerosis Múltiple es una de las principales enfermedades neurológicas entre los jóvenes en los países desarrollados y, en nuestro país, es la segunda causa de discapacidad en dicho sector de la población tras los accidentes de tráfico. Se caracteriza principalmente por la presencia de:

1. Brotos: los pacientes debutan con un brote que puede afectar a uno o varios sistemas funcionales (piramidal, cerebeloso, sensitivo, visual, etc.) repercutiendo en su movilidad, visión, lenguaje, etc. A este brote le suele seguir un periodo de remisión con recuperación total o parcial de las capacidades mermadas. Los brotes se van repitiendo a intervalos de tiempo que varían de unos enfermos a otros.

2. Desmielinización: los axones neuronales, debido a la intervención de células del sistema inmune que se activan por causas hasta el momento no del todo conocidas, pierden parte de su vaina de mielina interrumpiéndose así la transmisión del impulso nervioso (**Figura 1**). La subsiguiente pérdida axonal se concentra en focos de desmielinización que pueden detectarse mediante técnicas de imagen como la resonancia magnética o MRI (del inglés *Magnetic Resonance Imaging*) y la Tomografía Axial Computerizada o TAC.

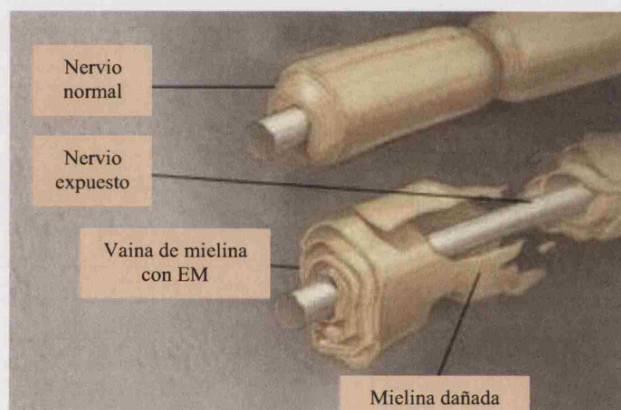


Figura 1. Comparación entre nervio normal y nervio dañado en la esclerosis múltiple (Mayo Foundation for Medical Education and Research).

3. Autoanticuerpos: aparecen anticuerpos autorreactivos dirigidos frente a proteínas presentes en el SNC, como la Proteína Básica de la Mielina (MBP, del inglés *Myelin Basic Protein*) y otras, que se detectan en Líquido Cefalorraquídeo (LCR). Esto ha hecho que se plantee un posible origen autoinmune de la enfermedad.

La valoración de la discapacidad se realiza según la Escala de Discapacidad de Kurtzke (EDSS, del inglés *Expanded Disability Status Scale*) [1] que describe las alteraciones correspondientes a cada uno de los 20 niveles en una escala de 0 hasta 10 (en intervalos de media unidad), siendo el último nivel la muerte por EM. Con esta escala se hace el seguimiento de la evolución clínica de los enfermos y se emplea en la valoración de la respuesta a tratamiento en los ensayos clínicos. A pesar del significativo impacto que la enfermedad tiene en la calidad de vida de los pacientes, su esperanza de vida es tan sólo ligeramente inferior a la de la población sin EM.

▪ PREVALENCIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La EM tiene una prevalencia que oscila dependiendo del área geográfica que se considere. En términos generales, se estima que es de 60-100 casos por cada 100.000 habitantes, pero en los países desarrollados (Europa Occidental, Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda y Australia) esta prevalencia es mucho mayor que en el resto. En contraposición, en Asia, África y América del Sur y Central se encuentra un bajo número de afectados y las cifras están por debajo de ese intervalo. Se ha observado además que parece existir un gradiente Norte-Sur en el número de casos, de tal modo que en países más fríos del Norte de Europa y zona norte de Estados Unidos y Canadá hay mayor prevalencia que en países centroeuropeos o en zonas centrales de Estados Unidos, y en éstos más que en los países Mediterráneos y del Sur de Estados Unidos [2].

■ FORMAS CLÍNICAS EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Se considera que hay cuatro formas clínicas de la enfermedad según su evolución [3]:

☛ **Remitente-Recurrente (EM-RR):** es la forma en la que alternan brotes con afectación de uno o más sistemas funcionales, con periodos de remisión de la sintomatología en los que normalmente se recuperan las capacidades perdidas. Generalmente, con el tiempo, la recuperación de las funciones alteradas pasa a ser incompleta y con cada brote aumentan las secuelas (**Figura 2**).

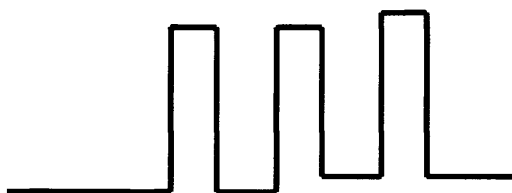


Figura 2. Forma clínica Remitente-Recurrente. Los enfermos sufren brotes a los que siguen periodos de remisión.

☛ **Secundaria Progresiva (EM-SP):** aparece normalmente en una fracción alta de los enfermos que debutaron con EM-RR; en ellos hay un momento en el curso de la enfermedad en el que no es posible discernir entre un brote y el siguiente porque no hay mejoría visible y el empeoramiento se vuelve progresivo (**Figura 3**).

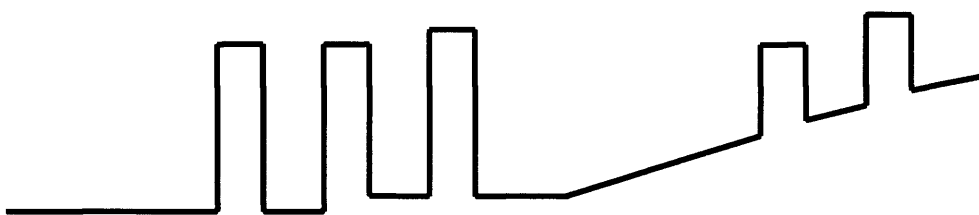


Figura 3. Forma clínica Secundaria-Progresiva. Tras presentar durante un tiempo un cuadro EM-RR, la recuperación de las capacidades es cada vez menor y el empeoramiento se vuelve constante con algunos picos de sintomatología.

➤ **Primaria Progresiva (EM-PP):** está caracterizada por un deterioro continuo desde el mismo inicio de la enfermedad, siendo esta forma muy agresiva y de rápida progresión (**Figura 4**).

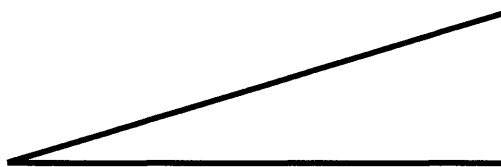


Figura 4. Forma clínica Primaria-Progresiva. Los enfermos no muestran los característicos brotes, sino que el empeoramiento es progresivo y sin recuperación de las capacidades perdidas.

➤ **Progresiva Recurrente (EM-PR):** desde su inicio presenta claras recaídas con o sin recuperación completa. Los períodos entre brotes se caracterizan por una continua regresión. Esta forma clínica se encuentra en muy baja proporción y es la más agresiva de todas (**Figura 5**).

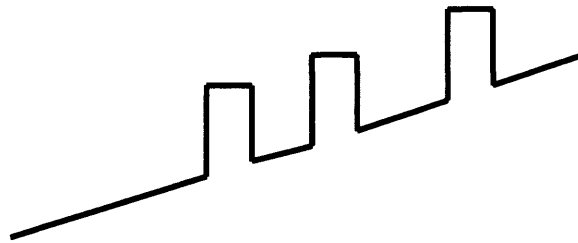


Figura 5. Forma clínica Progresiva-Recurrente. Los enfermos empeoran desde el comienzo y adicionalmente tienen episodios de agravamiento y posterior recuperación parcial.

La EM es una patología que, independientemente del área geográfica, afecta a las mujeres en doble proporción que los hombres, como sucede en otras enfermedades de naturaleza inflamatoria como la Artritis Reumatoide (AR), Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) y Enfermedad Celiaca (EC). Suele aparecer en personas jóvenes con edades comprendidas entre los 20 y los 40 años, aunque también se encuentran casos en los que la edad de debut baja hasta apenas los 3 años u otros en los que la sintomatología comienza en la vejez.

▪ MODELO ANIMAL DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Muchas enfermedades complejas tienen un modelo animal que presenta similares características a la enfermedad en el hombre. Estos modelos equivalentes resultan de gran utilidad en el estudio del origen de la enfermedad, los mecanismos

moleculares subyacentes, o las posibles terapias en el hombre, máxime cuando la etiología parece ser tan compleja como en este caso.

Para la EM existe un modelo en roedores (ratones, ratas y cobayas) denominado **Encefalomiелitis Experimental Autoimmune** o EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*). La inflamación del SNC es inducida en los animales por la inyección prolongada de proteínas de la mielina que, en condiciones normales, producen los oligodendrocitos que recubren los axones neuronales, y frente a las que se han encontrado anticuerpos en enfermos de EM. No obstante, la aparición de la enfermedad no se produce en todos los animales expuestos a esta proteína, sino sólo en unos cuantos que parecen estar predispuestos genéticamente. La EAE muestra a su vez algunas diferencias con la EM en cuanto a la evolución de la enfermedad, ya que el empeoramiento de los síntomas en la EAE es progresivo desde el principio y no presenta los típicos brotes y remisiones; se podría decir que en el modelo murino solo existe la forma primaria progresiva [4, 5]. Pese a estos inconvenientes, es el único modelo del que disponemos para los ensayos y por ello estos roedores tienen gran valor científico.

Un hecho particularmente curioso es el que se produjo cuando Pasteur, en el siglo XIX, estaba desarrollando la vacuna de la rabia. Varios individuos mostraron una sintomatología similar a la presentada por los ratones a los que se les induce la EAE, después de inyectarles una vacuna profiláctica post-exposición que había sido cultivada en conejos con rabia. La introducción de tejido nervioso de esos conejos en los afectados habría propiciado una respuesta del sistema inmune, no sólo dirigida frente al virus de la rabia, sino también frente a antígenos del propio sistema nervioso. Se podría decir que esa sintomatología observada en las personas vacunadas respondería a la versión humana de la EAE.

▪ DIAGNÓSTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

El diagnóstico de los pacientes se lleva a cabo atendiendo a varios criterios. En el año 1983, Poser y colaboradores establecieron sus criterios de diagnóstico [6] (**Tabla 1**). Posteriormente han aparecido otros autores que los han revisado y modificado, como sucede con los criterios que el grupo de McDonald propuso en el año 2001 [7] y que permiten un diagnóstico precoz.

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de Poser y colaboradores [6].

Esclerosis Múltiple Clínicamente Confirmada

1. Dos brotes, y evidencias clínicas de dos lesiones distintas.
2. Dos brotes, evidencias clínicas de uno de ellos, y evidencias paraclínicas de otra lesión distinta.

Esclerosis Múltiple Confirmada con Apoyo de Datos de Laboratorio

1. Dos brotes y evidencia clínica o paraclínica de una lesión + bandas oligoclonales en LCR o IgG elevada.
2. Un brote y evidencia clínica de dos lesiones separadas + bandas oligoclonales en LCR o IgG elevada.
3. Un brote, evidencia clínica de una lesión y paraclínica de otra lesión separada + bandas oligoclonales o IgG elevada.

Esclerosis Múltiple Clínicamente Probable

1. Dos brotes y evidencia clínica de una lesión.
2. Un brote y evidencia clínica de dos lesiones separadas.
3. Un brote, evidencia clínica de una lesión y paraclínica de otra lesión separada.

Esclerosis Múltiple Probable con Apoyo de Datos de Laboratorio

1. Dos brotes y bandas oligoclonales o IgG elevada.

Paraclínica = potenciales evocados, TAC o MRI; Al menos han de existir 2 bandas oligoclonales en LCR y ninguna en suero.

Posteriormente se han seguido publicando nuevas revisiones de los criterios tanto por parte de otros autores [8] como por el mismo Poser en el año 2006 [9].

▪ TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

En la actualidad existen varias terapias en uso (ej. interferón-beta), y varios fármacos en diferentes fases de ensayo clínico (ej. anticuerpos monoclonales anti- $\alpha 4\beta 1$). La elección de un tratamiento u otro depende de la forma clínica que presente el enfermo, la evolución de la enfermedad, la tolerabilidad al tratamiento, etc.

Los fármacos que se emplean en los pacientes que debutan con la forma Remitente-Recurrente son los que se detallan en la **Tabla 2**:

Tabla 2. Fármacos empleados en el tratamiento de EM en su forma Remitente-Recurrente. En la columna de la derecha se especifican los nombres comerciales por los que son conocidos.

Interferón-beta (IFN- β) 1 a	Avonex [®] , Rebif [®]
Interferón-beta (IFN- β) 1 b	Betaferon [®]
Acetato de Glatiramer (GA)	Copaxone [®]
Anti-VLA4 o Natalizumab	Tysabri [®]
Mitoxantrone	Novantrone [®]

El mecanismo de actuación del IFN- β no se conoce bien. Su descubrimiento fue azaroso ya que comenzó a administrarse en un intento por tratar lo que se pensaba que

eran procesos virales crónicos [10]. Se produjo su aprobación como tratamiento para la EM a pesar de que la administración de esta citoquina no resultaba tan efectiva en el caso del modelo experimental, la EAE, lo cual demuestra que no siempre el modelo animal de una enfermedad es fiel reflejo de su equivalente en humanos. En estos últimos, el tratamiento con IFN- β muestra buenos resultados a nivel de MRI, donde se puede apreciar una disminución de las áreas dañadas del SNC. Los resultados a corto plazo en la forma remitente-recurrente son tan sólo aceptables, ya que un porcentaje elevado de los pacientes (~35%) no responden al tratamiento con IFN- β y no experimentan una reducción en la tasa de brotes en comparación con la tasa de brotes previa al inicio del tratamiento con este fármaco. La eficacia a largo plazo en los enfermos que presentan esta forma clínica, así como la eficacia inmediata o a corto plazo en las otras formas más severas es dudosa [11] y por ello existen otras terapias alternativas para estos casos. Otro descubrimiento fortuito fue el del Acetato de Glatiramer (GA, del inglés *Glatiramer Acetate*) como tratamiento para la EM, ya que en un origen se pensó que la administración de este copolímero sintético a roedores produciría la exacerbación de la sintomatología en la EAE. Sin embargo, el efecto observado fue el opuesto al esperado: los animales experimentaron una mejoría, y tras los ensayos clínicos exitosos en humanos comenzó su administración en los enfermos de EM [10]. Cuando la terapia inmunomoduladora (IFN- β y GA) no surte efecto, se pasa a los fármacos de segunda línea como el mitoxantrone y el natalizumab.

El Natalizumab es uno de los últimos fármacos incorporados al mercado para el tratamiento de la forma EM-RR. Se trata de un anticuerpo monoclonal anti-VLA-4 (comercializado como Tysabri[®]) que va dirigido contra la cadena α de la integrina $\alpha 4\beta 1$. La eficacia de este tratamiento radica en que, con el bloqueo de esta integrina, se impide la migración de linfocitos al SNC consiguiendo más de un 90% de reducción de las

lesiones en MRI y del 50% en los brotes o recidivas, según un ensayo de 6 meses de duración [12]. También bloquea la acción de la integrina $\alpha 4\beta 7$. Actualmente este fármaco está en la fase IV de ensayo clínico en Europa (estudio observacional de seguridad post-comercialización). En el año 2005, dos pacientes que estaban siendo tratados con esta sustancia en terapia combinada con IFN- β , fallecieron debido a una infección cerebral llamada Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva, tal y como la prensa difundió. Esta afección está producida por el virus JC que es muy frecuente en la población (aproximadamente el 80% de las personas tiene anticuerpos frente a él) pero que sólo causa daños en aquellos enfermos con una severa inmunodepresión, como sucede en algunos pacientes con HIV. Parece que este anticuerpo monoclonal, al impedir la migración de células del sistema inmune hacia el SNC, deja “indefenso” al cerebro ante cualquier patógeno, y en esos casos este virus oportunista fue responsable de la muerte de los pacientes. Como medida cautelar se suspendieron todos los ensayos que se estaban llevando a cabo y su comercialización. Tras un estudio de seguridad, se permitió de nuevo su prescripción y comercialización como monoterapia para la EM.

Los pacientes que presentan la forma Secundaria-Progresiva con brotes pueden beneficiarse de terapia inmunomoduladora (IFN- β). En ausencia de recaídas, se pueden valorar tratamientos como el mitoxantrone, en función del grado de progresión del deterioro neurológico. No obstante, la potencial toxicidad de esta droga hace que sea conveniente estimar los riesgos y beneficios para cada paciente antes de su prescripción.

Para la forma Primaria-Progresiva no existe a día de hoy ningún fármaco que frene la evolución de la enfermedad, y en el caso de la forma Progresiva-Recurrente, se puede valorar la administración del mitoxantrone cuando el curso de la enfermedad es muy agresivo, con muchos picos de exacerbación.

▪ ETIOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Las causas que originan la enfermedad en un individuo aún no se conocen con exactitud aunque se ha avanzado bastante en estos últimos años. Los estudios realizados hasta la fecha apoyan un origen multifactorial de la EM en el que determinantes genéticos y ambientales interactúan hasta desembocar en una alteración de la respuesta inmune en ciertos individuos genéticamente susceptibles. Este hecho tendría como consecuencia un proceso inflamatorio descontrolado, que se traduciría en enfermedad.

- Factores ambientales

Entre los **factores ambientales** que pueden estar participando en la aparición de la enfermedad se barajan varias posibilidades. Entre ellas se postulan el estilo de vida o la migración hacia países de mayor incidencia [13], lo que explicaría el número de casos notablemente superior en los países desarrollados. También se postula que la infección por ciertas bacterias y virus influya en la aparición de la EM [14, 15], ya que se han detectado anticuerpos frente a ellos en pacientes. Entre los virus más estudiados están el virus Epstein-Barr (EBV) [16], el Citomegalovirus (CMV) [17] y el Herpesvirus-6 (HHV-6) [18, 19], todos ellos pertenecientes a la familia *Herpesviridae*.

No se conocen con exactitud los mecanismos por los que estos virus podrían inducir la aparición de EM. Se ha planteado que la existencia de homología entre péptidos virales procesados por las células presentadoras de antígenos y algunos péptidos presentes en SNC (vainas de mielina) promueve, una vez controlada la infección viral, una respuesta inmune alterada frente al antígeno que se encuentra en el

SNC [20]. Por otra parte, algunos virus de esta familia han desarrollado estrategias de inmunoevasión dirigidas frente a las moléculas presentadoras de antígeno tanto de MHC de clase I como de clase II. El CMV es capaz de inhibir la expresión de estas moléculas, de deslocalizarlas secuestrándolas en vesículas y de sintetizar otras sustitutivas para evitar ser descubiertos por el sistema inmune del hospedador [21-23]. En cualquier caso, no se sabe con exactitud cómo este hecho podría alterar la respuesta inmunológica hasta desembocar en la pérdida axonal que se produce en la EM.

- Factores genéticos

Por otro lado, la sospecha de la existencia de un **componente genético** en la aparición de la enfermedad fue confirmada por estudios de agregación familiar. Se observó que dentro de una familia que presentaba algún caso de EM, la probabilidad de que otro familiar estuviera afectado por EM era significativamente mayor que la probabilidad de que un individuo del resto de la población tuviera EM. Conforme a esto se definió el **parámetro λ** , que representa la relación existente entre la prevalencia entre familiares de enfermos y la prevalencia en la población general:

$$\lambda = \frac{\text{Prob. Familia}}{\text{Prob. Población General}}$$

También se han realizado estudios en gemelos monocigóticos y dicigóticos, observándose una concordancia de 6 a 11 veces superior en los primeros frente a los segundos [24]. Entre hermanos no gemelos la concordancia también es superior al resto

de la población. Así, el parámetro λ_s (*siblings* –hermanos-) es aproximadamente 30 (la prevalencia de la enfermedad entre los hermanos de un paciente de EM es unas 30 veces superior a la existente en la población general) [25, 26].

La localización de regiones candidatas a influir en la aparición de la EM, así como en otras enfermedades poligénicas, se realizó con estudios de ligamiento llevados a cabo en familias *multiplex*, es decir, con varios afectados en dos o más generaciones [27, 28]. Con ellos se identificaron diversas regiones del genoma que mostraban picos de asociación con la enfermedad. De esta forma se buscan posibles alteraciones genéticas que se están transmitiendo de los enfermos de una generación a los de las generaciones siguientes. Hasta la fecha se han llevado a cabo múltiples estudios de barrido genómico cuya finalidad es la de identificar los *loci* que contienen genes de susceptibilidad [29].

Entre las regiones genéticas descritas, la más importante es la del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), que contiene genes implicados en la respuesta inmune, y que se revisa con más detalle a continuación. A pesar de ser el principal *locus* asociado hasta ahora, él sólo explicaría el 30% del componente genético de la enfermedad, dejando una fracción importante por explicar con otros genes [26].

- Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad o MHC (*Major Histocompatibility Complex*) es una región cromosómica con una elevada densidad de genes relacionados con la respuesta inmune. Esta denominación es genérica ya que es una zona muy

conservada y está presente en numerosas especies. En el hombre, el MHC se conoce como Antígeno Leucocitario Humano o HLA por sus siglas en inglés (*Human Leukocyte Antigen*) y está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21) (véase esquema de la pág. 30, **Figura 6a**). Tradicionalmente esta región se ha dividido en tres Clases. El MHC de Clase I en humanos es el que está situado más próximo a la región telomérica, el MHC de Clase II es el más próximo al centrómero y entre la Clase I y la Clase II encontramos el MHC de Clase III (**Figura 6b**).

Esta región cromosómica se extiende hasta 4 Mb, aunque la región clásica que abarca desde el gen *DRB1* hasta el gen *HLA-A* ocupa 1 Mb, y está caracterizada fundamentalmente por dos hechos: en primer lugar, presenta un altísimo grado de polimorfismo o variabilidad, y en segundo lugar, en ella existe un elevado Desequilibrio de Ligamiento (LD, del inglés *Linkage Disequilibrium*). La variabilidad existente, sobre todo en las clases I y II, se debe a que las secuencias de los genes aquí codificados albergan numerosos polimorfismos que dan lugar a proteínas funcionales con pequeñas variaciones entre sí. Esto hace que un individuo sea probablemente heterocigoto en todos los *loci* y aumente sus posibilidades de identificación y eliminación de mayor variedad de patógenos, y que, por otra parte, sea muy complicado encontrar dos individuos no emparentados que sean idénticos.

El LD es un fenómeno genético por el que una determinada combinación de alelos situados en distintos *loci* aparece en la población con una frecuencia superior a la que se esperaría por azar. Esos alelos conforman un **Haplotipo**, que cuando está muy conservado se denomina **Haplotipo Ancestral** (AH, por las siglas en inglés *Ancestral Haplotype*), y entre ellos es raro el fenómeno de recombinación genética. En otras zonas

del genoma también existe LD pero este se extiende a fragmentos de unas 40-100 Kb mientras que en el caso del HLA la extensión que alcanza el LD es considerablemente superior (mayor de 15 veces para algunos haplotipos ancestrales como el AH8.1, que alcanza más de 1 Mb).

Como ya se ha apuntado, los genes codificados en el MHC están directamente implicados en la respuesta inmune, especialmente en la presentación antigénica, y se agrupan en las tres clases citadas:

1. MHC de Clase II

La región de Clase II contiene genes que codifican proteínas dedicadas a la presentación antigénica, como son *DR*, *DP* y *DQ*, así como otros genes accesorios que ayudan en la presentación de péptidos (*DM*, *DO*, *TAP1*, *TAP2*...). Estas moléculas de Clase II se expresan en la superficie de todas aquellas células con capacidad presentadora: células dendríticas y macrófagos principalmente; los linfocitos B pueden desempeñar también esta función y por tanto también las expresan. Las proteínas que estas células captan se procesan y reducen a pequeños péptidos de 13-17 aminoácidos, los cuales, unidos a estas moléculas de Clase II, migran a la superficie celular y allí son expuestos para que puedan ser reconocidos eventualmente por los linfocitos T CD4⁺. En el caso de la Esclerosis Múltiple, esta región adquiere gran importancia debido a que varios estudios de asociación han encontrado una relación entre algunos alelos de la molécula DR y dicha enfermedad [30]. En la población española, al igual que en las

demás, el alelo que confiere susceptibilidad a EM es el *HLA-DR2* [31], presente en aproximadamente el 35% de nuestros enfermos, mientras en los controles sanos no supera el 18%. Esta es la asociación genética más fuerte encontrada hasta el momento. En análisis más detallados se ha visto que, a su vez, algunos alelos del gen DR se dividen en subtipos. La molécula de DR consta de una cadena α y una cadena β . Tan sólo la cadena β es polimórfica y por eso para estudiar los subtipos del alelo *HLA-DR2* analizamos la secuencia que la codifica en el gen *HLA-DRB1*. Así, el estudio de *DR2* muestra en nuestra población los subtipos *HLA-DRB1*1501*, **1502*, **1601* y **1602*, detectables por técnicas de biología molecular que se detallarán en otro apartado. En EM, el subtipo asociado es el *HLA-DRB1*1501* [30], presente en un elevadísimo número de los enfermos de EM (92%) que son positivos para *HLA-DR2* (35% del total). En los individuos sanos que son *HLA-DR2* (18% del total) este subtipo está en el 77% de ellos, porcentaje significativamente inferior al encontrado en los enfermos.

Se han postulado varios mecanismos por los que esta proteína puede estar implicada en la aparición de la EM. Uno de ellos es que este subtipo concreto, *DRB1*1501*, presente algún péptido del SNC de manera muy efectiva a linfocitos T $CD4^+$ autorreactivos que no fueron eliminados en la selección tímica y que, de esta manera, se induzca una respuesta inflamatoria que lleve a la desmielinización de los axones neuronales. Otra teoría existente que explicaría su mayor frecuencia en los enfermos de EM es la del mimetismo molecular, por la que un péptido de un patógeno muy parecido a otro péptido presente en el SNC es presentado a los linfocitos T $CD4^+$ por la molécula MHC de clase II induciendo la respuesta inflamatoria destinada a eliminar dicho patógeno. Una vez eliminado, los linfocitos T activados reconocerían el péptido del SNC y se establecería una respuesta autoinmune [20].

También existe una fuerte asociación del alelo *DQB1*0602* con la susceptibilidad a padecer EM. En nuestra población, este alelo aparece casi siempre conjuntamente con el alelo *DRB1*1501* debido precisamente al elevadísimo LD existente en esta zona. Así, es difícil saber cuál de los dos alelos es el verdadero responsable de la susceptibilidad a la enfermedad. Sin embargo, en estudios realizados en otras poblaciones en las que el alelo *HLA-DQB1*0602* aparece con cierta frecuencia en ausencia del alelo *DRB1*1501* y viceversa, el alelo *DRB1*1501* con otros alelos distintos del *DQB1*0602*, se ha encontrado asociación del subtipo *DRB1*1501* por sí mismo con la EM [32]. Según esto, el responsable de la asociación hallada del haplotipo *DRB1*1501-DQB1*0602* es el subtipo de DR, y la asociación del *DQB1*0602* se debe al estrecho LD con *DRB1*1501*.

No obstante, el mecanismo exacto que incrementa el riesgo a padecer EM se desconoce y en cualquier caso estas teorías tan solo explicarían la enfermedad en ese porcentaje de pacientes que son *HLA-DRB1*1501* positivos, con lo que aún quedaría un buen número de casos por explicar.

2. MHC de Clase I

Los genes codificados en la Clase I originan proteínas que también presentan péptidos, pero en este caso procedentes del interior de la propia célula. Algunos de los genes codificados aquí son *HLA-A*, *B*, *C*, etc. que también son polimórficos y tienen numerosos alelos. Los virus, al infectar las células, emplean la maquinaria celular para

sintetizar sus propias proteínas. El mecanismo de defensa que tienen esas células infectadas es precisamente la presentación de péptidos de unos 8-10 aminoácidos que provienen de la degradación de esas proteínas virales. Los linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos se activan al reconocer a las moléculas de Clase I unidas a esos péptidos y rápidamente destruyen la célula infectada y con ello el virus. Para evitar el ataque, los virus tratan de suprimir la expresión de genes de Clase I y así impedir que la célula que han infectado sea destruida por los linfocitos T CD8⁺. Los organismos neutralizan este mecanismo viral gracias a las células NK, que detectan todas aquellas células que no expresan Clase I en su superficie y las destruyen. El inconveniente es que muchos virus han desarrollado como contraataque métodos de inmunoevasión y ellos mismos son capaces de producir moléculas similares a las de Clase I.

Interesantemente, en esta zona del MHC se localiza el primer gen que mostró asociación con la Esclerosis Múltiple, el gen *HLA-B*. Concretamente, el alelo *B7* resultó conferir susceptibilidad a padecer EM [33], aunque un tiempo después se supo que esa asociación se debía a que *B7* está en estrecho LD con *DRB1*1501* dentro del haplotipo AH7.1 [34].

3. MHC de Clase III

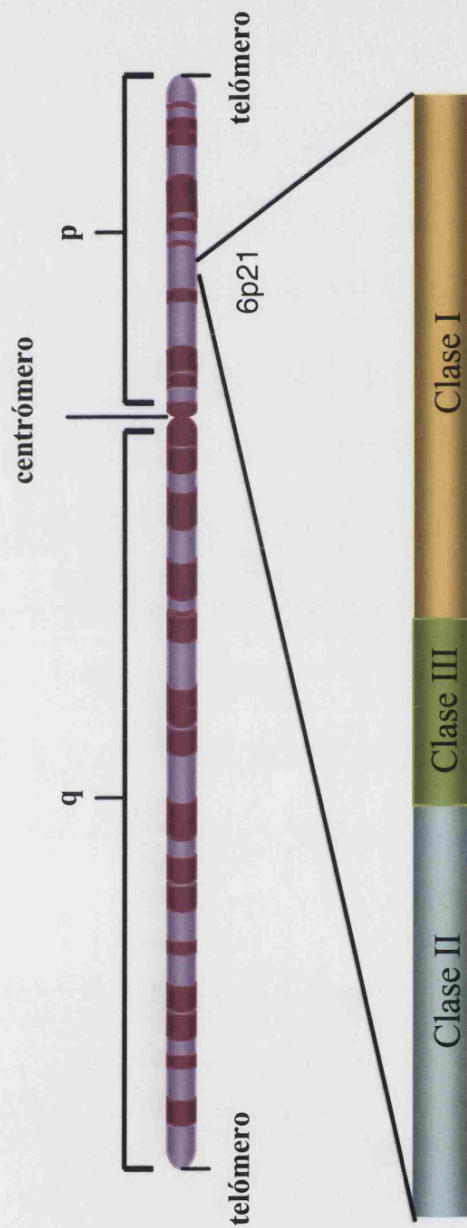
Por último encontramos la Clase III, que contiene los genes de citoquinas inflamatorias y otras proteínas con importante papel en la inmunidad. Entre ellos tenemos el gen del Factor de Necrosis Tumoral (*TNF*), la Linfotoxina alfa (*LT-A*), la Linfotoxina beta (*LT-B*), y algunos genes del sistema del Complemento. Se han

estudiado polimorfismos en algunos de estos genes y, como en el caso de la Clase II, se han encontrado asociaciones con la enfermedad. Es difícil *a priori* saber si el efecto es debido a estos genes, ya que también hay LD con los genes de Clase II y aparecen en haplotipos ancestrales muy conservados que contienen el alelo de Clase II *HLA-DRB1*1501*. Nuestro grupo describió la asociación de un Polimorfismo de un Solo Nucleótido (SNP) localizado en el promotor del gen *TNF*, una transición G→A en posición -376, con la EM. Se encontró que el alelo -376*A está aumentado en enfermos al compararlos con los controles y que esta asociación es independiente de la asociación encontrada con el alelo *HLA-DRB1*1501* [35, 36].

Además de estudiar SNPs en el gen, se estudiaron dos microsatélites localizados en ese locus, *TNFA* y *TNFB*. Ambos polimorfismos están en estrecho LD y no aparecen todas las combinaciones o haplotipos teóricos posibles en nuestra población. En ella se vio una asociación muy significativa del haplotipo *TNFA11b4* con la EM. Este haplotipo está aumentado en nuestra población de enfermos por lo que confiere susceptibilidad a padecer EM, pero el motivo de esta asociación es que dicha combinación alélica es más frecuente en el contexto del AH 7.1, que contiene la variante *DRB1*1501*, y por tanto la asociación del *TNFA11b4* es dependiente de *DR*.

Aunque el objeto de esta tesis no es el análisis de la susceptibilidad conferida por el MHC, habrá que tenerlo en cuenta para justificar la estratificación que hacemos de nuestro grupo de enfermos por el factor de susceptibilidad *DRB1*1501*.

6a)



6b)

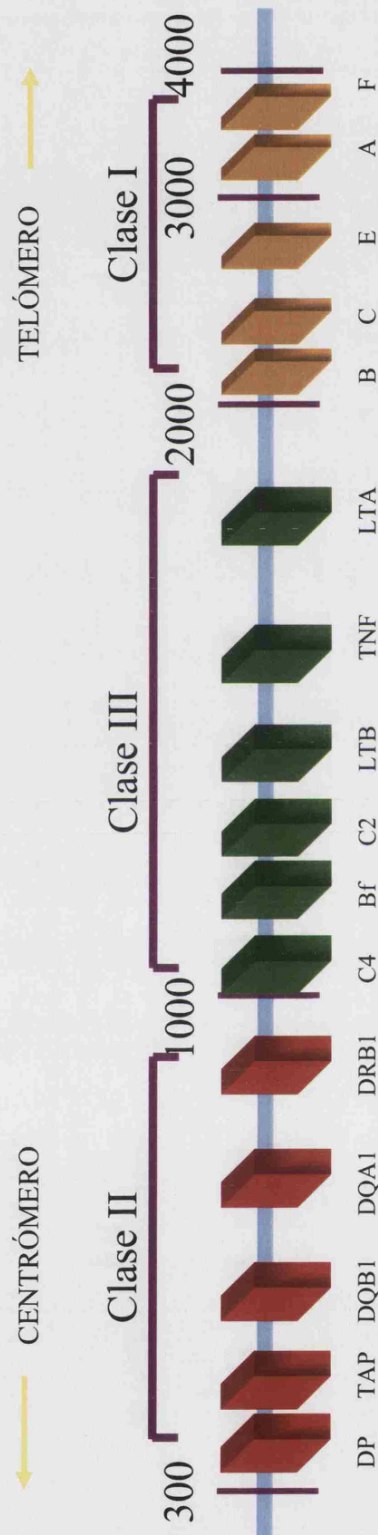


Figura 6: 6a) Esquema del cromosoma 6 que contiene la región del MHC en su brazo corto (6p21). 6b) detalle de la posición de algunos de los genes localizados en el MHC, como son *DRB1*, *DQB1*, *TNF*, *A*, *B*...

▪ GENÉTICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Los estudios genéticos que se han desarrollado hasta hace poco con la finalidad de conocer mejor la patogénesis de la Esclerosis Múltiple, se han centrado principalmente en la región del HLA, situada en el cromosoma 6, por ser éste el *locus* que con más fuerza se ha hallado asociado en estudios de ligamiento. Como ya se ha comentado, el principal factor genético de susceptibilidad a la EM en nuestra población es el alelo de MHC de clase II *DRB1*1501*. Se han encontrado otros marcadores asociados a esta patología en genes clase III y I pero, dada la particularidad de que en esta región el desequilibrio de ligamiento es elevado, hay veces que distinguir si el efecto se debe *per se* a los polimorfismos de dichos genes o si los responsables son otros genes que frecuentemente los acompañan es complicado.

Esta región ha sido extensamente analizada por numerosos grupos y en multitud de poblaciones. El hecho de que existan casos de familias en las que, sin que esté presente el alelo de HLA que confiere susceptibilidad, *DRB1*1501*, haya más de un enfermo de EM apoya la idea de que la carga genética de la enfermedad no reside únicamente en 6p [37], y que otros genes han de estar interviniendo en la aparición de la enfermedad. Los enfermos que poseen el principal alelo de susceptibilidad constituyen un 40% del total y queda un 60% de enfermos en los que otros factores genéticos así como ambientales han de estar interactuando para originar la enfermedad.

Por todo lo anterior, en este trabajo nos alejamos de este *locus* y buscamos en otras regiones que contienen genes directamente implicados en la respuesta inflamatoria o inmune. Además del interés por el estudio puramente genético, tratamos de establecer la relación entre alguno de estos genes con factores ambientales, ya que se considera

que la interacción de genes-ambiente en individuos susceptibles determina la aparición de la enfermedad. Dejamos atrás, pues, el estudio del MHC y comenzamos un recorrido por distintos genes con la idea de arrojar un poco más de luz acerca del origen de esta enfermedad de consecuencias dramáticas.

En las siguientes páginas se van a detallar los genes que han sido objeto de análisis en el presente trabajo y los antecedentes que nos han llevado a su estudio en nuestros enfermos de Esclerosis Múltiple.

ESTUDIO DE GENES CANDIDATOS

Como ya se ha mencionado y por la gran cantidad de bibliografía existente, la región del HLA en el locus 6p21 juega un papel crucial en la genética de la Esclerosis Múltiple y de hecho se sospecha que contiene más de un gen asociado a la enfermedad [37, 38]. Aunque muy influyente, dicha región no explica ni mucho menos el 100% de la carga genética de la enfermedad y aún queda mucho por investigar. La respuesta inmunológica que surge en esta patología es muy compleja y numerosos genes podrían estar participando en ella de forma muy débil cuando se analizan por separado. La acción conjunta de todos ellos es la que resultaría fatal.

Una vez que se ha analizado detalladamente este *locus* se continúa la búsqueda exhaustiva por otras regiones. Los estudios de barrido genómico y de ligamiento han señalado determinadas zonas del genoma (cromosoma 17, 19, 12, 5, etc.) como candidatas a albergar genes implicados en la etiopatogenia de la EM [39, 40].

En la respuesta inmunológica se ponen en marcha mecanismos muy complejos y bien regulados de señalización, transcripción y traducción, en los que un gran número de sustancias (citoquinas, quimioquinas, segundos mensajeros, factores de transcripción, etc.) entran en juego. La correcta regulación de la expresión proteica es fundamental para el buen funcionamiento de esta respuesta inflamatoria y cualquier alteración en la misma puede derivar en un proceso patológico.

Moléculas directamente implicadas en la regulación de la transcripción son los factores de transcripción. Estos son capaces de reconocer determinadas secuencias reguladoras en el DNA, o bien unirse a proteínas que a su vez reconocen el DNA, y favorecer la transcripción de genes.

En este trabajo, analizamos dos de esos factores de transcripción que regulan la expresión de genes directamente implicados en la respuesta inmunológica:

1. MHC2TA: transactivador de la expresión de moléculas de MHC de clase II. (*MHC class II Transactivator*).
2. EBF: factor temprano de linfocitos B (*Early B-cell Factor*).

1. MHC2TA

Este gen recibe el nombre de *MHC2TA* por sus siglas en inglés, *MHC Class II TransActivator*, y codifica una proteína que promueve la transcripción de los genes situados en la región de MHC de clase II, que se denomina CIITA. Abarca unas 42 Kb y está situado en 16p13, región vinculada con la EM en estudios de ligamiento [26, 39]. Posee 4 promotores diferentes conocidos como pI, pII (del que no se conoce la función ni donde se expresa), pIII y pIV en una amplia región reguladora (**Figura 7**), que son responsables de la expresión de este gen en células dendríticas, linfocitos B, y astrocitos y microglía, respectivamente [41]. Cada uno de ellos precede a un primer exón diferente para cada promotor, que por *splicing* se une al resto de los exones en común, eliminando los otros promotores y su exón adyacente [42].



Figura 7. Esquema de la región promotora del gen *MHC2TA*. Tiene cuatro promotores diferentes, cada uno con su propio exón 1, que pueden dar lugar a cuatro transcritos diferentes. El resto de los exones son comunes [41].

Este transactivador es el principal regulador de la activación de la transcripción de las moléculas de MHC de clase II, como vimos, esenciales para la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4⁺, y otros genes accesorios en la presentación antigénica (cadena invariante o Ii, *DM*, *DP*). También participa, aunque en menor grado, en la transcripción de otros genes situados en MHC de clase I [43]. Las células dendríticas, linfocitos B, macrófagos y células epiteliales tímicas (TEC) expresan *MHC2TA* de manera constitutiva, mientras que en otros tipos celulares la expresión puede ser inducida por diferentes factores, siendo el principal y más potente de ellos el IFN- γ . Por el contrario, moléculas como TGF- β , IFN- β e IL4 actúan como represores de *MHC2TA* [44].

Dado que la producción de las moléculas de MHC de clase II depende directamente de la expresión de *MHC2TA*, todos los factores reguladores que acabamos de citar afectan indirectamente a la expresión de estas moléculas presentadoras de antígenos. Los genes situados en MHC de clase II presentan promotores complejos. CIITA actúa como co-activador sin llegar a unirse directamente al DNA sino a través de otros factores unidos al promotor. Así surge un complejo proteico llamado “enhanceosoma” en el que CIITA es crucial, que será el punto de partida para la puesta en marcha de la maquinaria de la transcripción [44].

La represión de CIITA tiene por tanto, como lógica consecuencia, la inhibición de la síntesis de moléculas de MHC de clase II. Este hecho repercute en la normal presentación antigénica y defensa del organismo frente a patógenos dado que no se produce la respuesta inmunológica pertinente. No hay que olvidar que, aunque en menor grado, también se suprime la expresión de moléculas de clase I.

Una de las terapias que podría resultar efectiva en el tratamiento de la EM es el uso de las estatinas [45], aunque los mecanismos por los que estas moléculas ejercen efectos inmunomoduladores y anti-inflamatorios, tratándose de drogas que normalmente se emplean para disminuir los niveles de colesterol ya que inhiben la síntesis de la HMG-CoA, siguen siendo debatidos. Estos fármacos inhiben la expresión de genes de MHC de clase II, aunque de momento no se conoce bien cuál es su mecanismo de acción [46, 47]. Teniendo esto en cuenta, sería interesante estudiar si características heredadas influyen en la variación en la respuesta al tratamiento de cada individuo. Muchos fármacos que hoy en día se administran para el tratamiento de enfermedades como la Esclerosis Múltiple, interaccionan directa o indirectamente con los genes y su expresión. Variaciones genéticas en determinados enfermos podrían hacer que la actividad de los fármacos se viera alterada de forma que el efecto que producen se potenciase o disminuyera. Esa podría ser una manera de explicar en parte porqué en unos enfermos el tratamiento tiene éxito mientras que en otros no se produce mejoría de la clínica, o inclusive, la administración resulta contraproducente. El estudio en detalle y el conocimiento de los factores genéticos que afectan a la respuesta de un individuo enfermo a cierto fármaco, podría ayudar a saber *a priori* si ese fármaco producirá el efecto esperado o no frente a la patología a tratar. Este tipo de estudios constituyen el campo de la “farmacogenética”, que más adelante será abordada en otro de los análisis realizados en esta tesis. Con esa información se podrían desechar algunos tratamientos sin llegar a administrárselos a determinados enfermos, lo que supondría un ahorro económico considerable al Sistema Nacional de Salud, y se escogerían otros tratamientos más efectivos desde el principio, lo que supondría también un beneficio importante para el paciente que, desde el diagnóstico de su enfermedad, comenzaría un tratamiento más eficiente.

Estudios desarrollados por un grupo en Artritis Reumatoide, infarto de miocardio y Esclerosis Múltiple en población británica [48], así como los realizados en nuestro laboratorio en enfermedades como EII (CU y Enfermedad de Crohn) y AR [49], arrojaron resultados dispares encontrándose asociación tan sólo en el segundo caso. En dicho estudio se analizó una transición A→G situada en posición -168 del promotor III (pIII) y una transversión G→C exónica en la región codificante (exón 11).

Por todo esto creemos que este gen es un buen candidato para estudiar su implicación en la susceptibilidad a EM ya que el proceso de presentación antigénica parece jugar un importante papel en esta enfermedad en la que existe una respuesta inmunológica alterada frente a antígenos propios presentes en el SNC. Con esta finalidad nos centramos en dos de los marcadores que incluyeron Swanberg y colaboradores en su trabajo [48], que son el SNP del promotor del gen *MHC2TA* en posición -168 y la transversión del exón 11.

2. *MHC2TA* y su relación con infección viral

Entre los métodos de inmunoevasión de algunos parásitos intracelulares se ha descrito la represión de la expresión de moléculas presentadoras de antígeno. El citomegalovirus humano (CMV) codifica inhibidores de la ruta de presentación de antígenos mediada por moléculas de MHC de clase I y clase II. Este virus es capaz de utilizar la maquinaria de las células que parasita para producir proteínas (US2, US3, etc.) que impiden la expresión en superficie de moléculas de clase II y promueven su deslocalización en el citoplasma celular [22, 23, 50, 51]. Esto parece indicar que la presentación de antígenos endógenos a los linfocitos T CD4⁺ por parte de la clase II es importante en la lucha contra las infecciones virales, aunque la presentación de esos antígenos se lleve a cabo principalmente mediante moléculas de MHC de clase I y vaya dirigida a los linfocitos T CD8⁺.

Otra táctica para impedir la expresión de moléculas de DR en la superficie de células infectadas es la empleada por el Herpes Virus Simplex-1 que codifica una proteína llamada glicoproteína B capaz de sustituir a la cadena invariante (Ii) y que permanece unida en lugar de ella a las moléculas de DR (MHC de clase II). En lugar de liberar el sitio de unión de estas moléculas presentadoras en el momento en que un péptido antigénico aparece, la glicoproteína B permanece unida sin permitir la normal presentación antigénica. Además, altera la localización de las moléculas de DR mediante su “secuestro” dentro de las vesículas [21].

Debido a que los mecanismos de escape de varios virus al sistema inmune afectan a la presentación antigénica por parte de las moléculas de MHC de clase II [51], parece lógico pensar que la existencia de alteraciones en los genes que regulan la transcripción de las mismas, como es el caso del gen *MHC2TA*, pueda afectar al

desenlace final de esa inmunoevasión. Por esto, y por las razones expuestas en el apartado anterior que justifican la idoneidad del análisis de este gen, estudiamos los mismos marcadores antes citados en relación al estatus viral en suero de nuestros pacientes de EM.

3. *EBF1* (*Early B-cell Factor*)

Esta molécula llamada EBF (*Early B-cell Factor*) pertenece a una familia de factores de transcripción presente en mamíferos que está implicada en diversos aspectos del desarrollo. Todos los miembros de esta familia, a la que también se conoce por otros nombres como Olf, O/E o COE (Collier-Olf-EBF), presentan dominios de unión al DNA altamente conservados. Además, tienen motivos que permiten la formación de homodímeros, con cierta similitud estructural con los factores de transcripción HLH (del inglés *Helix-Loop-Helix*).

Se expresa en los linfocitos B durante su desarrollo en todos los estadios excepto en el de célula plasmática [52]. También se expresa en los adipocitos y en tejido nervioso interviniendo en el desarrollo neuronal.

La función principal de este factor de transcripción es la activación de genes necesarios para el reordenamiento de los genes V(D)J y el ensamblaje de los receptores de antígeno de los linfocitos B (BCR). El defecto en su expresión conlleva alteraciones en el desarrollo que afectan a los linfocitos B y al cerebro [53].

EBF activa directamente a múltiples genes en el desarrollo temprano de los linfocitos B y su papel parece ser crucial dado el efecto dramático observado en animales que carecen de él [54], aunque en esta tarea parece muy importante su interacción con otros factores [52]. El gen *EBF1* forma parte de una red de factores de transcripción en la que se encuentran E2A y Pax5, que determina el desarrollo de los linfocitos B. La regulación de la expresión de *EBF1* está regulada por factores de esa misma red como por ejemplo E2A, y por sí mismo, uniéndose a su propio promotor.

El gen *EBF1* está localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q34). Dado que hasta la fecha no se han llevado a cabo ensayos genéticos con este factor de

transcripción, sólo hay datos de estudios funcionales en la literatura. El estudio de este factor de transcripción tiene un doble interés en la EM: por un lado nos interesa mucho el papel que juega en el desarrollo de los linfocitos B, ya que ellos son responsables de la producción de anticuerpos autorreactivos que se han identificado en estos pacientes [55], y por el otro, debido al papel que juega esta molécula en la migración axonal y en la maduración de las neuronas. Para tratar de analizar el papel que juega este gen en la enfermedad nos centramos en el estudio de dos marcadores seleccionados atendiendo únicamente a parámetros genéticos por no haber descrito ninguno con papel funcional: un SNP situado en el intrón 7 y un microsatélite dinucleotídico (CA)_n que se encuentra en el intrón 6 del gen.

La regulación de la expresión de los genes es crucial para que nuestras células desempeñen una tarea determinada en el momento preciso. El gen *EBF1* es imprescindible para la maduración y supervivencia de los **Linfocitos B**. El último estadio en la maduración de los linfocitos B es el de célula plasmática, al que llegan gracias a la expresión de *EBF1* en todos los estadios previos, pero en el que la inhibición de la expresión de este mismo gen es un requisito necesario. Las células plasmáticas son las encargadas de producir y secretar inmunoglobulinas. Estas moléculas se unen a los antígenos que reconocen, y ellas a su vez, son reconocidas por otras células que tienen los receptores adecuados en su membrana. La parte de las inmunoglobulinas que es reconocida por esas células es su fragmento cristalizante (Fc), y ese reconocimiento se efectúa a través de los receptores para Fc (FcR). Estos receptores transducen la señal de las Igs al interior de la célula que los contiene y se pone en marcha en ella una respuesta necesaria para poder eliminar el patógeno reconocido por el anticuerpo. El siguiente gen que ha sido objeto de estudio en esta tesis está muy relacionado con este proceso.

4. *FcRL3 (Fc Receptor Like-3)*

Esta proteína recibe su nombre por tratarse de un “Homólogo de los Receptores clásicos del fragmento cristalizante de las IgG”. El gen que la codifica está situado en el cromosoma 1q21-23 en un *cluster* que contiene otros genes FcRL (también conocidos como FcRH) como son FcRL1-6, FcRX y FcRY. Estos genes pertenecen a una familia de proteínas muy conservada filogenéticamente; existen ortólogos en ratón, perro,

mono, humano, etc. No se conoce muy bien cuál es su ligando pero se supone que se trata de la región Fc de las IgG por la gran homología que tiene con los receptores clásicos del fragmento cristizable. Se trata de moléculas que se expresan en la superficie celular salvo en el caso de FcRX, que puede ser intracelular o secretada. La expresión de FcRL1-5 se produce principalmente en las células B del centro germinal, intrafoliculares y de regiones intraepiteliales, mientras que FcRL6 es producida por los linfocitos T y NK [56].

Estructuralmente estas proteínas cuentan con una región extracelular compuesta por un número variable de 3 a 9 dominios y con una región intracelular que tiene colas citoplásmicas con Motivos de Activación (ITAM) y/o Inhibición (ITIM) basados en tirosinas. Esta última característica también se da en los receptores clásicos. Gracias a estos motivos se establece un equilibrio entre señales positivas y negativas que lleva a establecer el control de los procesos inflamatorios (defensa) y de prevención de alteraciones en ellos que se traducirían en enfermedad [56].

En enfermos de Esclerosis Múltiple se han encontrado IgGs oligoclonales en LCR. Esas IgGs están dirigidas frente a antígenos localizados en SNC, como la MBP, tal y como se exponía al comienzo de este trabajo.

La proteína FcRL3 cuenta con dominios citoplásmicos que incluyen motivos ITAMs e ITIMs [56]. Esto la dota de una elevada complejidad funcional y hace que alteraciones en la proteína pudieran tener como consecuencia una desregulación en las respuestas de los linfocitos B, que conllevaría la producción de anticuerpos autorreactivos. Estudios funcionales llevados a cabo han encontrado que existe una mayor actividad del promotor de *FcRL3* medida con un gen “*reporter*” y mayor unión de éste con NF- κ B al analizar el polimorfismo situado en su promotor en posición -169. En concreto el alelo -169*C, que un grupo japonés encontró asociado a la Artritis

Reumatoide [57] así como un estudio en pacientes neerlandeses [58], es el que parecía responsable del aumento de actividad de la expresión del gen. También se ha encontrado asociación de otros polimorfismos del gen *FcRL3* con diversas enfermedades de naturaleza inflamatoria como la Enfermedad de Graves, la Tiroiditis de Hashimoto y el Lupus Eritematoso Sistémico [57, 59].

Ya que todas estas enfermedades comparten algunas características de su etiopatogenia, nos pareció apropiado el estudio de este gen en el caso de la Esclerosis Múltiple por ser un buen candidato a participar, al menos, en el ámbito de la inmunidad humoral de la enfermedad.

Clásicamente las respuestas inmunológicas adaptativas desarrolladas por los **Linfocitos T** se han dividido en dos tipos: Th1 y Th2. Esta división, sin embargo, no deja de ser una simplificación de los complejos mecanismos de producción de citoquinas que se ponen en marcha durante la respuesta inmune.

La respuesta de tipo Th1 se caracteriza porque en ella se producen numerosas citoquinas pro-inflamatorias siendo la más importante y representativa de todas ellas el IFN- γ . También se secreta IL2, TNF- α , IL12, etc. Determinadas enfermedades tienen un patrón de producción de citoquinas de tipo Th1, como sucede con la Esclerosis Múltiple, Artritis Reumatoide, Diabetes tipo 1, Enfermedad de Crohn, etc.

En la respuesta Th2 las citoquinas mayoritarias son IL4, IL5, IL13, etc. producidas por los linfocitos T *helper* 2. Este perfil de producción de citoquinas es el que aparece en respuestas frente a los alérgenos y en algunas enfermedades calificadas como autoinmunes tales como la Colitis Ulcerosa.

Las citoquinas, por su estructura, pueden ser de tipo I o de tipo II. Las primeras se agrupan porque todas ellas comparten una estructura tridimensional característica debida a la existencia de 4 α -hélices y se unen a receptores denominados “receptores de citoquinas de tipo I”. Las citoquinas de tipo II comparten una estructura similar entre sí y ligeramente diferente a las de tipo I y se unen a “receptores de citoquinas de tipo II”, que a su vez tienen distinta estructura que los receptores de citoquinas de tipo I.

En este trabajo analizamos:

1. IL4: citoquina tipo I propia de respuestas tipo Th2
2. IFN- γ : citoquina tipo II propia de respuestas tipo Th1

5. Interleuquina 4 (*IL4*)

La interleuquina 4 (*IL4*) es estructuralmente una citoquina de tipo I cuya presencia en el ambiente celular favorece la diferenciación de los linfocitos T hacia un perfil de tipo Th2. Las células NKT y los mastocitos se han sugerido como una fuente temprana de *IL4* para esos linfocitos T. Además de *IL4*, los linfocitos Th2 producen otras citoquinas del mismo tipo, como son la *IL5* y la *IL13*.

Tal y como sucede en caso del IFN- γ , la *IL4* favorece en los linfocitos B el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, pero a diferencia del IFN- γ como se verá, el isotipo aquí favorecido es el IgE. El mecanismo que emplea esta citoquina Th2 es similar al seguido por el IFN- γ : tras la unión con su receptor, la *IL4* pone en marcha la vía de señalización JAK-STAT. El factor de transcripción que en este caso se activa es STAT6. Una vez activado, pasa al núcleo de la célula donde es capaz de reconocer y unirse a una secuencia del DNA ("promotor") en el gen *IL4*, y con ello favorece una serie de cambios en el mismo que permiten una mayor accesibilidad de la maquinaria enzimática responsable de la recombinación. El resultado de esa recombinación es la expresión de una inmunoglobulina con una región constante correspondiente al isotipo IgE (C ϵ).

Si estudiamos esta citoquina desde el punto de vista de la EM que, como ya se ha dicho, es una enfermedad con un patrón de producción de citoquinas tipo Th1, siendo el mayor exponente de este grupo el IFN- γ , el papel que jugaría la *IL4* sería más bien anti-inflamatorio, y una producción elevada tendería a compensar el exceso de respuesta Th1 en la enfermedad. Sin embargo, en aquellas patologías en las que se produce una respuesta mayoritaria de tipo Th2, esta citoquina tiene consecuencias nefastas. Eso sucede en enfermedades como el asma o en enfermos atópicos en los que

se ha podido encontrar una fuerte relación con polimorfismos localizados en los genes *IL4* y de la cadena alfa del receptor de *IL4* [60]

El receptor de la *IL4* (*IL4R*) tiene en común con *IL2*, *IL7*, *IL9*, *IL15* e *IL21*, la cadena gamma común (γ_c).

El gen de la *IL4* está codificado en el brazo largo del cromosoma 5, dentro de un *cluster* de citoquinas localizado en la banda citogenética 5q23-31. En esta zona también se encuentran otros genes que codifican proteínas relevantes asociadas con otras enfermedades inflamatorias. Tal es el caso de los transportadores catiónicos *OCTN1* y *OCTN2*, en cuyos genes *SLC22A4* y *SLC22A5* se han hallado polimorfismos asociados con Artritis Reumatoide [61, 62], diabetes tipo 1 [63] y enfermedad de Crohn [64, 65].

Estudios previos en enfermos de EM no encuentran asociación de un SNP del gen de la *IL4* con la susceptibilidad a padecer esta enfermedad [66-70]. También hay trabajos realizados en otras enfermedades, como la enfermedad de Graves, en el que analizan 4 SNPs del promotor del gen de la *IL4* sin hallar asociación de ninguno de ellos con esta patología [71], en Artritis Reumatoide [72-74] y en Diabetes tipo 1 [75]. Un trabajo en población japonesa no encontró asociación de este gen con Diabetes tipo 1, aunque sí lo hizo con LES [76].

6. Interferón-gamma (IFNG)

Es una citoquina pro-inflamatoria que, estructuralmente, se clasifica dentro de las citoquinas de tipo II y es producida por linfocitos T y células NK, siendo su principal misión la de activar a los macrófagos. Pertenece, junto al IFN- α y al IFN- β , a la familia de los interferones aunque, a diferencia de éstos, es un interferón de tipo II (aquí hay que tener cuidado de no confundir el hecho de que sea una citoquina que estructuralmente es de tipo II, con la clasificación de los interferones, para mayor confusión del lector, en la que el IFN- γ se encuadra dentro de los de tipo II).

Se denominaron interferones porque interfieren con la replicación viral en aquellas células infectadas por virus. El IFN- γ participa tanto en la inmunidad innata, al ser producido por las células NK en respuesta a la presencia de patógenos o inducidas por la acción de la IL12, como en la inmunidad adaptativa, al ser secretada por los linfocitos T una vez que reconocen un antígeno, y con la ayuda, también en este caso, de la IL12. A pesar de que esta citoquina posee cierta capacidad antiviral, su principal función es la de actuar como mediador en la inflamación durante la respuesta inmunológica.

El IFN- γ es un homodímero que cuando se une a su correspondiente receptor hace que se active la vía de señalización de las proteínas JAK-STAT. En este caso, el factor de transcripción STAT1 es el activado por esta citoquina.

Entre las funciones destacadas del IFN- γ se pueden citar:

- Activación de los macrófagos: el IFN- γ promueve la expresión de enzimas que favorecen la producción de especies reactivas del oxígeno para la destrucción de los microbios fagocitados.

- Incremento de la presentación antigénica: estimula la expresión de moléculas de MHC de clase I y II, así como de coestimuladores en las células presentadoras de antígeno.
- Diferenciación a Th1: favorece el paso de los linfocitos T CD4⁺ *naive* a tipo Th1 e inhibe la proliferación de los Th2.
- Cambio de isotipo: en los linfocitos B el IFN- γ favorece el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas a ciertas subclases de IgG, las cuales se unen a los Fc γ R de los fagocitos y activan al complemento. Así facilitan la fagocitosis de partículas opsonizadas. En contraposición, la IL4 promueve el cambio de isotipo a IgE propia de respuestas Th2. Esto pone de manifiesto la importancia del ambiente de citoquinas a la hora de determinar el patrón de inmunoglobulinas en un proceso inflamatorio.

Múltiples estudios han tratado de poner de manifiesto con éxito el papel que un exceso de IFN- γ tiene en numerosas enfermedades autoinmunes. Al igual que en la EM, en otras enfermedades autoinmunes de tipo Th1 (Artritis Reumatoide, Uveítis, Diabetes tipo 1 y varias enfermedades autoinmunes de la piel como Psoriasis, Vitíligo y Alopecia areata) se ha comprobado que los tratamientos anti- IFN- γ consiguen que se produzca una mejoría en la clínica [77]. Así mismo, se han llevado a cabo varios estudios de polimorfismos del gen del IFN- γ y de sus receptores, con resultados diversos en cuanto a la asociación con la EM [78-80]. Por el contrario, en la enfermedad celiaca se encontró asociación de una variante funcional del gen de IFN- γ con la enfermedad [81]. Con estos datos previos no se podría afirmar que exista una clara asociación de los polimorfismos estudiados en este gen con todas las enfermedades que comparten un perfil de citoquinas Th1.

Relación con tratamiento con IFN- β :

Hace algunos años comenzó a suministrarse otro interferón, el IFN- β , bajo varios nombres comerciales (Rebif®, Avonex®...), como tratamiento frente a la progresión de la EM y contra la aparición de brotes. El IFN- β y el IFN- α , denominados interferones de tipo I, median la respuesta inmunitaria precoz frente a las infecciones víricas. Ambas citoquinas se unen al mismo receptor, un heterodímero perteneciente a la familia de receptores de citoquinas de tipo II, que actúa mediante la vía de transducción de señales de las proteínas JAK-STAT, y por tanto ambos inducen respuestas biológicas similares, si no idénticas. El efecto protector observado en los enfermos tratados con esta sustancia es, como ya se ha dicho y por desgracia, bastante modesto, y casi las dos terceras partes de nuestros enfermos de EM (65%) no responden a este tratamiento mostrando algún brote en los dos primeros años del suministro de este fármaco.

Dado ese efecto paradójico que tiene el IFN- β nos pareció interesante buscar la posible relación existente entre la respuesta a este fármaco y el gen *IFNG* mediante el estudio de un polimorfismo con papel funcional, con la idea de ver si determinadas variantes del mismo podrían predecir la evolución de los enfermos sometidos a este tratamiento.

Las principales citoquinas producidas por los linfocitos T tienen además la misión de estimular la producción de otras muchas citoquinas por parte de otras células que participan en la respuesta inmune. El IFN- γ y la IL4 inducen diferentes respuestas efectoras muchas de ellas a su vez mediadas por otras citoquinas efectoras como las que a continuación se describen.

7. Osteopontina (OPN)

La Osteopontina (OPN), también llamada *Eta-1* (del inglés *Early T-cell activation gene-1*), es una glicoproteína fosforilada que secretan los macrófagos y los linfocitos T, ambos cuando están activados. Está presente en numerosos tejidos, pero principalmente aparece en tejido óseo, en células del cerebro y diversos epitelios especializados. También se puede detectar en fluidos biológicos (sangre, orina, etc.). En situaciones patológicas se puede encontrar en otras localizaciones y prueba de ello es que aparece en el fluido extracelular de focos de inflamación [82]. Esta citoquina media en interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. En el hueso hace que los osteoclastos, responsables del catabolismo óseo, se unan a la matriz ósea, ya que permite las interacciones de la integrina de la superficie celular $\alpha\beta 3$ y de CD44 (receptor de ácido hialurónico) con ésta. En ratones “knock-out” para el gen *OPN* se ha comprobado que existe un defecto en la resorción ósea [83].

El gen *OPN* está situado en el brazo largo del cromosoma 4 (4q13) y consta de 7 exones que se extienden a lo largo de 11 Kb aproximadamente. Se expresa tempranamente en los linfocitos T, dentro de las 48 horas posteriores a una infección

bacteriana. La interacción de la proteína resultante con los macrófagos puede inducir respuestas inflamatorias ya que juega un papel muy importante en la quimiotaxis: favorece la migración de macrófagos y células dendríticas hacia los focos de inflamación [84].

La activación de los linfocitos T hace que la transcripción del gen *Eta-1* aumente. Weber y colaboradores demostraron que la OPN es un factor supresor de los linfocitos T que promueve la proliferación de los linfocitos B [85]. Esta proteína interacciona con varios receptores de membrana (además de los ya citados CD44 y $\alpha v\beta 3$, hay otras integrinas a las que se puede unir, como son $\alpha v\beta 5$, $\alpha 4\beta 1$...) gracias a un motivo de unión que posee conocido como “motivo Arginina-Glicina-Aspartato” (RGD). Con la unión resultante de esa interacción se promueve la adhesión celular, migración y funciones específicas de señalización. Existen otras secuencias dentro de la OPN que pueden mediar la adhesión celular. Por ejemplo, la ruptura de la OPN por parte de la trombina deja expuesta la secuencia de aminoácidos SVVYGLR, que promueve la adhesión de células que expresan integrinas con cadena $\alpha 4$ y con $\alpha 9$ [86].

Hay estudios de la OPN en los modelos animales de Esclerosis Múltiple, es decir EAE, y de Artritis Reumatoide, la artritis inducida por anticuerpos frente a colágeno o CAIA por sus siglas del inglés *Collagen Antibody-Induced Arthritis*. En un trabajo desarrollado con ratones se vio que aquellos que eran deficientes en esta proteína desarrollaban una versión de EAE atenuada [87]. En el estudio con ratones con CAIA realizado por Yamamoto y colaboradores [88], el bloqueo de la proteína OPN con anticuerpos dirigidos frente a la secuencia aminoacídica expuesta tras la ruptura por trombina, disminuía la sinovitis y el infiltrado de células inflamatorias en las articulaciones de estos ratones al compararlos con ratones con CAIA *wild-type*. En otro trabajo, los ratones con CAIA deficientes en OPN mostraban menor hinchazón articular

y experimentaban una destrucción atenuada del cartílago articular al compararlos con ratones artríticos normales y no presentaban, como estos últimos, niveles tan altos de moléculas indicadoras de destrucción articular en orina [89]. Estos datos apoyarían el papel de la OPN en procesos de inflamación y daño articular en la Artritis, aunque en otro trabajo posterior, Blom y colaboradores pusieron en entredicho los resultados obtenidos en AR por el grupo de Yamamoto, y achacaron la asociación encontrada a un defecto en la elaboración del modelo animal deficiente en OPN [90].

De cualquier manera, parece que la OPN juega un papel importante en los procesos inflamatorios y es necesario buscar variantes que puedan indicar una alteración de su actividad normal que haga que se llegue a la situación de alteración observada también en la EM. En la literatura clásicamente se han estudiado cuatro polimorfismos en este gen: 327T/C, 795C/T, 1128A/G y 1284A/C. Al observarse que estos cuatro polimorfismos conformaban sólo dos haplotipos principales y ser, por tanto, prácticamente equivalentes decidimos estudiar únicamente uno de ellos: 795C/T

8. Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (*MIF*)

La proteína MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*) es una potente citoquina pro-inflamatoria y moduladora de la respuesta inmune e inflamatoria. Fue descubierta en el año 1966 como una sustancia capaz de inhibir la migración de los macrófagos [91] y fue la primera citoquina descrita.

El gen *MIF* está localizado en el cromosoma 22q11.2 y es de pequeño tamaño (<1 Kb). Consta de tres exones y su transcripción origina únicamente una proteína

funcional que se expresa en multitud de tejidos (**Figura 8**). En algunos de estos tejidos, como riñón e hígado, se ha encontrado un alto nivel de expresión de MIF [92].

En ratones se vio que la secreción de MIF estaba ligada a la secreción de ACTH [93]. Además, la administración de glucocorticoides en dosis bajas favorece la producción por parte de los macrófagos de MIF [94]. Este efecto es contrario al papel de los glucocorticoides de suprimir la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Por eso se propuso que esta citoquina actuaba tanto a nivel sistémico, comportándose como una citoquina endocrina, como a nivel local, limitando las acciones anti-inflamatorias de los glucocorticoides en un proceso de *feed-back* o retroalimentación negativo. Sin embargo, en los humanos no se ha demostrado este mismo sistema de regulación [95].

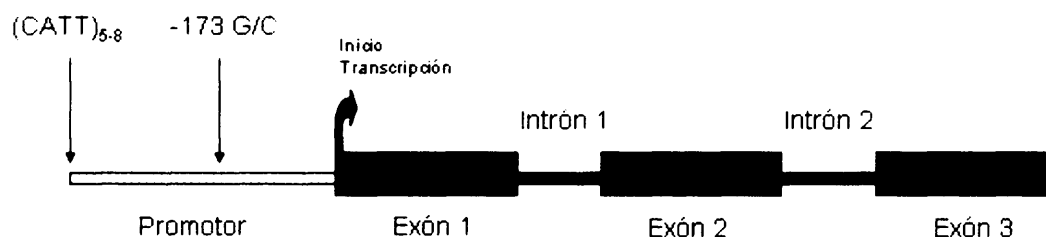


Figura 8. Esquema del gen *MIF*. En él se muestran los 3 exones que contiene separados por sus intrones y en el promotor se detallan los dos polimorfismos estudiados en este trabajo.

En el modelo animal de la Esclerosis Múltiple se ha visto como la administración de un anticuerpo monoclonal frente a la proteína MIF mejoraba la enfermedad en fase aguda [96]. Además, numerosos estudios han revelado niveles elevados de proteína MIF en el LCR de enfermos de EM con brote [97] y en el suero en el caso de varias enfermedades autoinmunes y de base inflamatoria crónica [98-100], hecho que sugirió que esta molécula pudiera tener un papel en la patogénesis de las

mismas. El problema que aparece siempre que se observan alteraciones en los niveles proteicos es que no se sabe si esas variaciones son causa o consecuencia de la patología. Por eso se comenzó el estudio del gen y sus variaciones con la finalidad de aclarar este interrogante. Una de esas variaciones es un microsatélite tetranucleotídico (CATT) descrito en el año 1994 [92], que se sitúa en posición -794 del promotor del gen *MIF*. También en la región 5' flanqueante, en el promotor, se halló un cambio de un solo nucleótido G→C en posición -173. Ambos marcadores han sido analizados en varios estudios. El alelo -173*C y el alelo (CATT)₇ se han encontrado asociados al aumento de susceptibilidad a diversas enfermedades autoinmunes, entre ellas Artritis Reumatoide, Sarcoidosis, etc. [101-104]. Así mismo, en los genes en los que se describe más de un polimorfismo, interesa analizar cuál es el desequilibrio de ligamiento a través del estudio de haplotipos. El LD existente en dicha región resultó ser elevado, como cabría esperar por su reducido tamaño, y la combinación formada por esos dos alelos concretos (-173*C / (CATT)₇) también ha mostrado asociación con esas patologías. El grupo de Donn analizó los haplotipos resultantes de la combinación de estos dos polimorfismos del promotor con otros dos situados en zona codificante [101]. Debido a la relación encontrada con otras enfermedades autoinmunes decidimos escoger esos mismos polimorfismos del promotor para estudiar el papel del gen en la EM y comprobar si ese efecto era extensible a esta patología.

9. Oxido Nítrico Sintasa Inducible (*NOS2A*)

El Oxido Nítrico (NO) es un radical libre gaseoso que funciona como mediador endógeno en varios de nuestros tejidos. Debido a su alta reactividad química, la producción de este gas de rápida difusión, catalizada por la Oxido Nítrico Sintasa (NOS), ha de estar muy controlada, tanto para conseguir especificidad en su señalización como para limitar su alta toxicidad. La enzima NOS existe bajo tres isoformas cada una presente en un tejido diferente: una isoforma presente en tejido neuronal llamada nNOS o NOS1; otra inducible bajo determinados estímulos conocida como iNOS o NOS2; y por último, una isoforma que se expresa en el endotelio y es llamada por ello eNOS o NOS3. Esta última isoforma (eNOS) juega un importante papel en la vasodilatación ya que el NO que se produce en las células musculares de los vasos sanguíneos activa una cascada de proteínas que, en última instancia, provoca el aumento del diámetro de los mismos. La nNOS y la forma inducible son formas solubles, mientras que la eNOS aparece anclada a la membrana de las células endoteliales. La isoforma inducible iNOS es la que acapara aquí nuestra atención, ya que actúa principalmente durante la inflamación inducida por la presencia de citoquinas, endotoxinas y demás estímulos proinflamatorios [105].

La enzima iNOS cataliza el paso, utilizando NADPH, de L-Arginina y O₂ a L-Citrulina y NO (**Figura 9**). El NO que producen los macrófagos activados permite que éstos sean capaces de eliminar los patógenos previamente fagocitados. Sin la intervención del NO, no sería posible completar la eliminación de las partículas fagocitadas y permanecerían en el interior de los fagosomas. Sin embargo, y como ya se ha comentado, el exceso de NO es tóxico y su producción ha de ser controlada. Se han propuesto varios probables mecanismos por los que el NO puede producir daño celular

en la EM: la acción tóxica directa de este gas, la lesión debida a la acción del peroxinitrito que se forma por la reacción del NO con el anión superóxido, la elevación del cGMP mediada por el NO, que hace que se incremente la citoquina TNF- α , etcétera [106, 107]. La producción de este compuesto está genéticamente regulada mediante el control de la transcripción del gen *NOS2A* por factores nucleares, entre los que se encuentra el factor de transcripción NF- κ B, en respuesta a lipopolisacárido (LPS) o a IL1 β . También están implicadas otras citoquinas, como el IFN- γ que actúa mediante la vía de transducción de señales de las JAK-STAT, y que promueve la expresión de la iNOS y con ella, la producción del NO.

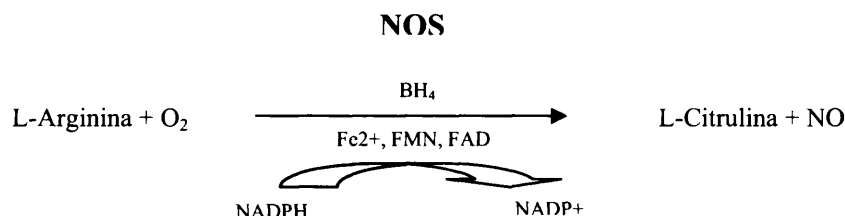


Figura 9. Formación de NO y L-Citrulina catalizada por la enzima NOS, utilizando NADPH y cofactores, a partir del aminoácido L-Arginina y oxígeno molecular.

La enzima NOS es una proteína en la que un motivo central de unión a calmodulina separa los extremos amino y carboxilo terminal. Para su activación esta enzima precisa la unión de calmodulina, promovida por el aumento de Ca^{2+} , y de tetrahydrobiopterina (BH_4), así como la formación de un homodímero. La regulación de los niveles de iNOS se produce fundamentalmente a nivel transcripcional y, aunque también se encuentra influenciada, es menos sensible a las variaciones en las concentraciones de Ca^{2+} que las otras isoformas [108].

El gen *NOS2A* está situado en el brazo largo del cromosoma 17, en la banda citogenética 11.2. Por *splicing* alternativo se pueden generar dos isoformas distintas, 1 y 2, con 27 y 28 exones respectivamente. Hasta el momento hay descritos en dicho gen al

menos 204 polimorfismos de un solo nucleótido. En la zona promotora se han descrito dos microsátélites: uno de ellos es un pentanucleótido (CCTTT) con numerosos alelos, y otro es una inserción/delección de un tetranucleótido (TAAA) de 4 ó 3 repeticiones respectivamente. Ambos marcadores, así como otros polimorfismos repartidos a lo largo de todo el gen *NOS2A*, han sido objeto de estudio en varias enfermedades en las que se produce una inadecuada respuesta inmunológica. Además de los estudios realizados en EM [109-113], hay varios centrados en diabetes [114, 115] y sus complicaciones como la retinopatía diabética y las nefropatías [116], en carcinomas gástricos [117], en la enfermedad celiaca [118], en EII (CU y Enfermedad de Crohn) [119-122], y en Artritis [123]. En EM, la diversidad de los resultados obtenidos por los diferentes grupos no había permitido hasta el momento establecer conclusiones claras, y existía la necesidad de seguir buscando pistas para esclarecer qué papel juega este gen en dicha enfermedad.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En este trabajo se abordará el estudio de varios genes (*MHC2TA*, *EBF1*, *FcRL3*, *IL4*, *IFNG*, *OPN*, *MIF* y *NOS2A*) íntimamente relacionados con la inflamación y la respuesta inmunológica. Para todos ellos se llevará a cabo un procedimiento común que consistirá en:

- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados en nuestros enfermos de Esclerosis Múltiple y en los controles sanos. Además analizaremos si existen diferencias en dichas frecuencias al estratificar el grupo de los enfermos de EM atendiendo a las formas clínicas y al sexo.
- Comparar dichas frecuencias entre ambos grupos, enfermos y controles, para comprobar si son significativamente diferentes.
- Estudiar la posible relación entre los genes estudiados y el principal factor genético de susceptibilidad (*HLA-DRB1*1501*) mediante la estratificación del grupo de enfermos por la presencia de dicho factor de susceptibilidad.
- Analizar, en caso de estudiar al menos dos polimorfismos, los haplotipos existentes en el grupo de enfermos y de controles y comprobar si existen diferencias en las frecuencias entre ambos grupos.
- Como modelo de estudio con familias realizaremos un estudio TDT para los genes *MHC2TA*, *EBF1*, *OPN* y *MIF*.
- Como modelo de análisis gen-ambiente, examinaremos el gen *MHC2TA* y su relación con la presencia/ausencia de replicación viral activa en el suero de los enfermos de Esclerosis Múltiple.
- Como modelo de análisis farmacogenético, relacionaremos la respuesta al Interferón-beta (IFN- β) con la presencia de polimorfismos en el gen del Interferón-gamma (*IFNG*).

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

▪ ENFERMOS DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Para la realización de este trabajo contamos con un total de 420 enfermos de EM recopilados consecutivamente en el servicio de Neurología (Unidad de Enfermedades Desmielinizantes) del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Todos ellos, de nacionalidad y ascendencia española, fueron diagnosticados atendiendo a los criterios de Poser [6], descritos anteriormente. De todos los participantes en este trabajo obtuvimos previamente el consentimiento informado. En el caso de 51 enfermos dispusimos además de ambos progenitores para efectuar un estudio familiar mediante el llamado Test de Desequilibrio de Transmisión (TDT).

La distribución de las muestras es la siguiente:

- Sexo: La distribución por sexo en nuestro grupo de enfermos es desigual tal y como se esperaba, dado que se ha visto que esta enfermedad afecta en una mayor proporción a las mujeres. Así, encontramos que el 61,3% de nuestros enfermos son mujeres frente al 38,7% de hombres.
- Formas clínicas: el 76,5% de los enfermos se incluyen dentro de la forma Remitente-Recurrente; el 13% pertenecen a la forma Secundaria-Progresiva; la forma Primaria-Progresiva afecta al 9,5%; por último encontramos que tan sólo uno de los enfermos de EM presenta la forma Progresiva-Recurrente, la más grave. La proporción 2:1 de mujeres vs hombres se mantiene excepto en la forma clínica EM-PP, en la que el porcentaje de hombres se iguala al de mujeres.

- Edad: la edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico es de 29 ± 9.2 años. La mayoría de los pacientes debuta entre los 20 y los 40 años y en raras ocasiones la enfermedad puede aparecer en la infancia o incluso en la vejez.

▪ CONTROLES

Como grupo control disponemos de muestras de DNA de 546 individuos caucásicos sanos no relacionados entre sí que han sido recopilados correlativamente. Las muestras proceden mayoritariamente de donantes de sangre, estudiantes y personal investigador sin antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes. Este grupo es independiente del grupo de enfermos de EM y está ajustado a éste étnicamente aunque no lo está por sexo ni por edad.

- Sexo: el 51% de los individuos incluidos en el grupo control son mujeres frente al 49% de hombres.

▪ PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Obtención del DNA a partir de las muestras

EL DNA puede obtenerse a partir de cualquier célula nucleada del organismo, puesto que cualquiera de ellas posee toda la información genética del individuo. En nuestro caso, se obtuvo a partir de la información genética contenida en los leucocitos

de sangre periférica obtenidos a partir de una muestra de 10 ml de sangre extraída a los pacientes [124].

- Cuantificación del DNA y estimación de su pureza

Una alícuota de la disolución de DNA (realizada en el paso anterior) se valoró por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm. Su pureza se estimó hallando el cociente entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm (ratio) aceptando como valor adecuado en nuestras condiciones el comprendido en el rango de 1.7 a 1.8.

La cuantificación del DNA se realizó teniendo en cuenta que una unidad de D.O. se corresponde con 50 ng/μl de DNA.

Con los datos obtenidos por espectrofotometría y con el fin de tener una concentración de DNA de 10 ng/μl hicimos la dilución de la muestra en agua destilada de acuerdo a cada caso.

- TIPAJE DEL HLA

- Tipaje de los genes de MHC de Clase II DRB1, DQA1 Y DQB1

Para estudiar los *loci* de clase II **DRB1**, **DQA1** y **DQB1** empleamos el método PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Oligonucleotid Probe*) que consta de las siguientes etapas:

- 1) Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del segundo exón de cada uno de estos genes por ser en ellos donde se concentran los polimorfismos que distinguen uno de otro alelo [125].
- 2) Transferencia del producto amplificado a una membrana de nylon mediante la técnica de Dot-Blot [125].
- 3) Hibridación con sondas oligonucleotídicas específicas del alelo presente en la muestra.
- 4) Revelado en placa fotográfica e interpretación de los resultados.

- Subtipaje del alelo *DR2*

Clásicamente, la nomenclatura serológica diferencia dentro del gen de clase II *DRB1* varios alelos o variantes que van desde el DR1 hasta el DR10 [125]. Dentro del alelo *DR2*, alelo asociado a la EM, existen a su vez cuatro subtipos en nuestra población: *DRB1*1501*, *DRB1*1502*, *DRB1*1601*, *DRB1*1602*. En nuestro laboratorio, la tipificación molecular del *DR2* la hemos realizado mediante sondas Taqman [126], técnica que se explica más detalladamente en el apartado “Análisis de Polimorfismos de un Único Nucleótido (SNPs)” (pág. 66). Una salvedad que se da en el subtipaje de *DR2* con respecto a la técnica de tipaje de SNPs mediante sondas TaqMan es que, en este caso, la especificidad de alelo viene marcada por los *primers* empleados y no por la sonda como se verá más adelante.

De nuestro conjunto de enfermos no fue posible llevar a cabo con éxito el tipaje de 6 de los individuos.

- TIPAJE DE LOS GENES FUERA DEL HLA

- Análisis de Polimorfismos de un Único Nucleótido (SNPs)

Uno de los métodos de análisis de los polimorfismos de un solo nucleótido es el uso de sondas específicas de alelo marcadas con fluorescencia. En nuestro laboratorio se han empleado las sondas TaqMan (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA).

Esta técnica se basa en una PCR a tiempo real en la que, con una pareja de *primers* o cebadores, uno en sentido *forward* y otro *reverse* se amplifica el fragmento que contiene el polimorfismo de interés. Junto con los *primers* y demás componentes de la reacción se añaden dos sondas u oligonucleótidos marcados en uno de sus extremos (normalmente el extremo 5') con diferentes fluorocromos, por lo general FAM (6-carboxifluoresceína) y VIC (4, 7, 2',4',5',7'-hexacloro-6-carboxifluoresceína). Cada una de esas sondas de menos de 20 nucleótidos que se denominan MGB (*Minor Groove Binder*) y se unen al surco menor del DNA, reconoce a una de las variantes, y por tanto se unirá a ella por complementariedad en el caso de que esté presente en la muestra.

Cuando las sondas están intactas la actividad fluorescente está “silenciada” por otra molécula que lleva en el otro extremo. Esta molécula es la denominada captadora o *quencher* que impide que el fluorocromo emita fluorescencia. Cuando la sonda encuentra un fragmento de DNA que contiene la secuencia complementaria se une a ella de manera específica. Si en su avance en sentido 5'→3', la polimerasa presente en la reacción encuentra una sonda hibridada a ese mismo fragmento se encargará de degradarla gracias a que presenta también actividad exonucleasa 5'→3'. Cuando una de estas sondas es degradada, el *quencher* deja de ejercer su efecto secuestrador sobre la

molécula fluorescente y ésta, al ser excitada por un láser, emitirá la fluorescencia pertinente según el fluorocromo que se trate.

A modo de ejemplo, supongamos que para un polimorfismo de un único nucleótido en el que las variantes que se pueden tener son adenina (A) o bien guanina (G), un individuo es homocigoto A, es decir, en el cromosoma que proviene del padre tiene A y en el de la madre también. Si la sonda que reconoce el alelo A estuviera marcada con el fluorocromo FAM, la fluorescencia que detectaríamos al final sería la correspondiente a dicho fluorocromo, ya que es el que estaba presente en la sonda que se ha unido al DNA y posteriormente ha sido degradada por la polimerasa, liberándose la fluorescencia. La sonda que reconoce G también estaba presente en el medio, pero al no unirse al DNA por no estar presente ese alelo, no ha sido degradada y el *quencher* sigue ejerciendo su efecto secuestrador sobre la molécula fluorescente, que en este ejemplo sería VIC.

Si se escogiera otro individuo homocigoto G (GG), sucedería al contrario y tan sólo veríamos fluorescencia de VIC, ya que sólo la sonda que reconoce el alelo G, que está marcada con esa molécula fluorescente, se uniría al DNA y por tanto se degradaría. En el caso de tratarse de un heterocigoto (AG), ambas sondas se unirían, cada una a su fragmento complementario, y al final encontraríamos fluorescencia correspondiente tanto a FAM como a VIC.

Es ésta una técnica con elevada especificidad y bastante eficaz para la determinación de este tipo de polimorfismos. La comercialización de ensayos “*on-demand*”, es decir, puestos a punto en unas condiciones estandarizadas, hace que sea relativamente rápido y sencillo realizar el tipaje de un buen número de muestras en periodos de tiempo reducidos, aumentando así la calidad y fiabilidad de los estudios.

Los marcadores analizados en cada uno de los genes que se han incluido en el presente trabajo vienen detallados más adelante (pág. 75), junto con su referencia.

Todos los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) incluidos en este estudio fueron analizados mediante ensayos TaqMan diseñados por *Applied Biosystems*, y el genotipado se efectuó en un 7900HT *Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) bajo condiciones de PCR estándar para todos ellos, con la única excepción del estudiado en el gen *MIF* como se verá más adelante. Dichas condiciones comunes son las representadas en la **Figura 10**.

La comercialización de estos ensayos TaqMan se caracteriza porque constan, por un lado, de una MasterMix que incluye enzima, nucleótidos, *buffer* y $MgCl_2$, común para todos los polimorfismos que tiene disponibles *Applied Biosystems*, y por el otro, se comercializan los primers y las sondas específicos para cada SNP. La MasterMix puede contener además una enzima llamada amperasaR cuya misión consiste en degradar, antes de que comience la PCR, toda posible contaminación por productos de otras reacciones previas. Dichos productos contaminantes contendrán Uracilo en lugar de Timina, puesto que la MasterMix incorpora dUTP, y la amperasaR se encarga precisamente de degradar todo DNA que contenga U, procedente, por tanto, de alguna amplificación previa.

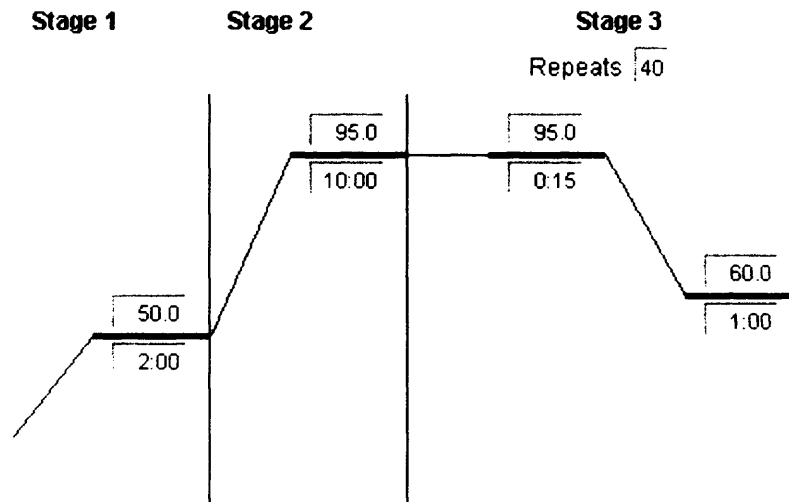


Figura 10. Condiciones estándar de PCR para los ensayos TaqMan que consisten en: 2 min a 50°C seguidos de 10 min a 95°C para la activación de la enzima; 40 ciclos en los que se repite un primer paso de 15 seg A 95°C para desnaturalizar el DNA y un segundo paso de 1 min a 60°C para hibridación de los *primers*. El proceso de elongación tiene lugar durante la rampa de variación de temperatura.

La utilización de la amperasaR es opcional y por eso no todas las condiciones de PCR tienen el paso inicial de 2 min a 50°C, que es el necesario para el funcionamiento de esta enzima, como ocurre en el caso del SNP estudiado en *MIF*.

○ Análisis de Microsatélites y VNTRs.

Los microsatélites son repeticiones en tándem de dos o más nucleótidos un número variable de veces. Se pueden encontrar a lo largo de todo el genoma tanto en zonas codificantes y reguladoras afectando a la transcripción, como en regiones intergénicas e intrónicas sin alterar la expresión génica. Existen enfermedades debidas al cambio en el número de repeticiones de un microsatélite en un gen que como consecuencia altera la proteína resultante de su expresión. Cada número de repeticiones

se considera un alelo. Así, si “n” repeticiones se denominan alelo 1, “n+1” repeticiones constituirán el alelo 2, y así sucesivamente.

En nuestro caso, el análisis de los microsatélites en la EM, así como en otras enfermedades complejas, resulta útil ya que se piensa que pueden estar actuando como marcadores genéticos, y no como factores etiológicos o causa de la patología. Esto quiere decir que cuando se encuentra asociación de algún alelo de un microsatélite con una patología, probablemente no es debida a dicho alelo en sí, sino a algún otro factor genético cercano funcionalmente responsable que aparecería muy frecuentemente junto a él por la existencia de LD entre ambos.

Para llevar a cabo el genotipado de una muestra para un microsatélite, primero se amplifica el fragmento de DNA que lo contiene mediante una PCR. Uno de los dos cebadores utilizados (de unos 20 nucleótidos cada uno) ha de estar marcado con una molécula fluorescente en el extremo 5' que puede ser FAM, HEX u otro fluoróforo. El resultado de esta reacción de amplificación será la obtención de millones de copias del fragmento de DNA que contiene el microsatélite de interés. El tamaño del fragmento amplificado variará según el alelo o número de repeticiones del microsatélite que presente la muestra, siendo éste mayor cuantas más repeticiones tenga.

Para determinar el alelo o alelos (en caso de tratarse de un individuo heterocigoto) presentes en la muestra, se realiza una electroforesis capilar en un secuenciador automático 3100 *Abi Prism Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Previo a introducir las muestras en el equipo para genotiparlas, estas deben ser preparadas. La mezcla que hay que realizar es la siguiente:

1. 1 µl del producto de PCR.
2. 10 µl de formamida (*Applied Biosystems*), que es un agente desnaturizante.

3. 0,6 µl del marcador de tamaño de fragmentos de DNA (GeneScan ROX 400HD, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA).

La mezcla se calienta a 95°C durante 3 min para que los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las bases complementarias del DNA se rompan y las dos hebras se separen. Seguidamente, se hace bajar la temperatura de la muestra hasta los 4°C, pero las hebras no se vuelven a unir por complementariedad debido a la presencia de la formamida, que se une a la cadena de DNA impidiendo que se vuelvan a formar los puentes de hidrógeno entre bases complementarias y por ende, evitando la renaturalización del DNA. El marcador de tamaño está formado por un conjunto de pequeños fragmentos de DNA de distinta longitud, para todos ellos conocida, que van desde 50 hasta 400 nucleótidos en determinados intervalos. Todos estos fragmentos están marcados en su extremo 5' con la molécula fluorescente ROX (6-carboxi-X-rodamina).

Los fragmentos del marcador tienen los tamaños, según el número de nucleótidos, que aparecen en la **Figura 11**. Este secuenciador automático permite procesar 16 muestras simultáneamente y volcar los datos en el sistema informático que lleva acoplado. La base de esta técnica reside en el marcaje fluorescente: todos los fragmentos de DNA, ya sean los procedentes de la PCR o del marcador de tamaño citado, presentan algún tipo de fluorescencia. Los fragmentos de DNA van migrando desde el cátodo, por donde entran en el capilar gracias a la diferencia de potencial generada, hasta el ánodo, cargado positivamente, dado que el DNA tiene carga negativa.

R, 1	•	5.75	50.00
R, 2	•	6.12	60.00
R, 3	•	7.17	90.00
R, 4	•	7.52	100.00
R, 5	•	8.17	120.00
R, 6	•	9.15	150.00
R, 7	•	9.47	160.00
R, 8	•	10.09	180.00
R, 9	•	10.39	190.00
R, 10	•	10.70	200.00
R, 11	•	11.32	220.00
R, 12	•	11.91	240.00
R, 13	•	12.51	260.00
R, 14	•	13.12	280.00
R, 15	•	13.42	290.00
R, 16	•	13.71	300.00
R, 17	•	14.28	320.00
R, 18	•	14.85	340.00
R, 19	•	15.41	360.00
R, 20	•	15.97	380.00
R, 21	•	16.52	400.00

Figura 11. Fragmentos presentes en el marcador de tamaño con el que se construye la curva patrón para determinar el tamaño de la muestra desconocida. La columna de la izquierda indica el fragmento de que se trata. La R hace referencia al fluoróforo con el que están marcados (ROX) que se visualiza en rojo, y el número, al orden de menor a mayor según su tamaño. La columna central representa el momento (min) de su detección tras la incidencia del láser sobre la molécula fluorescente. La columna de la derecha recoge los diferentes tamaños, ya conocidos, según el número de nucleótidos de cada fragmento de DNA.

La matriz que rellena el capilar es un polímero especial que no interfiere con la carga de las muestras (POP-4, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). La velocidad de migración de los fragmentos es inversamente proporcional a su tamaño, con lo que los fragmentos más pequeños se desplazarán más rápido. En el cátodo hay situado un láser que, al incidir sobre los fragmentos según van llegando, causa la excitación de los fluoróforos que llevan asociados. Como respuesta, estas moléculas emiten fluorescencia a una longitud de onda determinada y diferente para cada tipo de fluorocromo que es registrada por el aparato. El software acoplado (GeneScan v.3.7, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) procesa toda la información recogida y con la correspondiente a todos los fragmentos del marcador de tamaños construye una curva patrón (tiempo vs. longitud en pb). En ella se interpola el momento en el que el fragmento cuyo tamaño tratamos de identificar es detectado, y de esa manera se puede averiguar su tamaño y asignar el alelo que le corresponda. Los resultados aparecen en una gráfica que

representa en el eje de ordenadas la intensidad de fluorescencia y en el de abscisas el tiempo transcurrido de electroforesis que, gracias al patrón interno de tamaño, es transformado en tamaño de los fragmentos medido en pb (**Figura 12**).

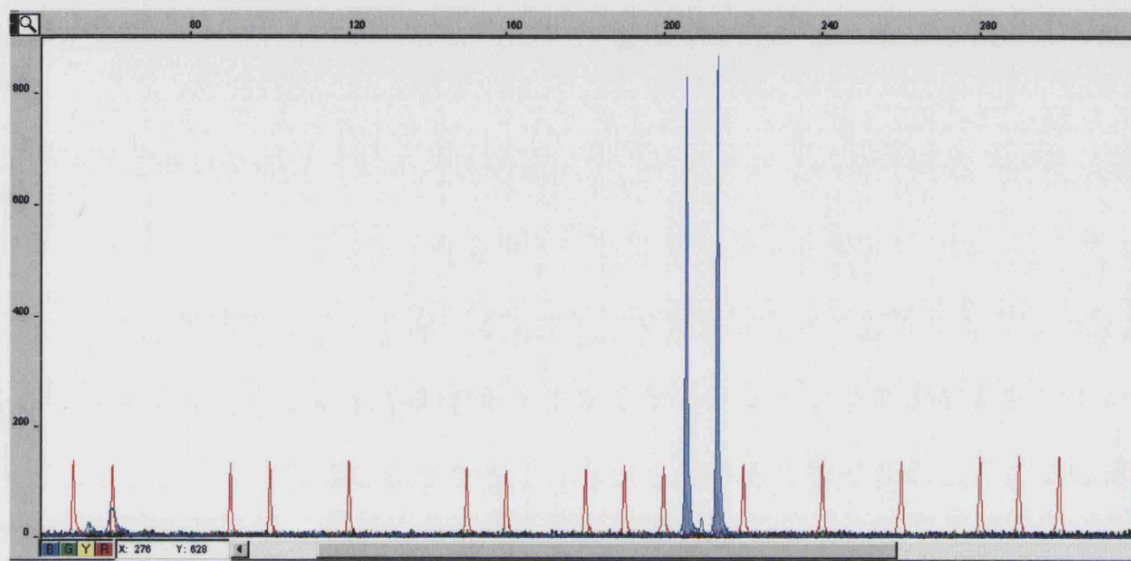


Figura 12. Representación de un microsatélite en un individuo en el GeneScan v.3.7 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). En el eje vertical se representa la intensidad de fluorescencia mientras que el horizontal representa el momento de llegada de los fragmentos de DNA, que se traduce en el tamaño en pb gracias al patrón. En rojo aparecen los fragmentos del patrón de tamaño (GeneScan ROX 400HD *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) marcados con ROX, mientras que en azul (FAM) está marcado el microsatélite. El primer pico rojo se correspondería con el fragmento del patrón con 50 nucleótidos, el siguiente con el de 60 nucleótidos, y así sucesivamente. Los dos picos azules son los dos alelos presentes en el individuo analizado, de lo que se deduce que es heterocigoto para ese microsatélite.

Una vez se han asignado los genotipos de las muestras analizadas se incorpora la asignación alélica de cada individuo en una base de datos para efectuar las comparaciones pertinentes.

Con este software la adjudicación alélica se realiza manualmente según el tamaño que tenga. Después, para introducir los datos de todos los individuos en la base habría que hacerlo uno por uno. La existencia de un programa capaz de asignar automáticamente esos alelos para cada muestra analizada y posteriormente exportar una tabla con los datos a la base permite un ahorro de tiempo sustancial. Con este programa,

llamado GeneMapper v.32 RTM (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), se pueden crear patrones para leer de manera automática las muestras, y tras una revisión de las muestras por parte del usuario descartando adjudicaciones erróneas y/o corrigiéndolas, se pueden volcar los resultados directamente en la base de datos.

Los microsatélites incluidos en este trabajo se analizaron siguiendo esta metodología con pequeñas variaciones de unos a otros. Las condiciones de la PCR dependen de la temperatura de unión de los primers (T_m) utilizados para cada microsatélite.

- Detección de HHV-6A

Para la detección de la cadena común a las variantes A y B del HHV-6 se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real mediante el uso de sondas TaqMan y una MasterMix (Bioron GmbH, Germany) tal y como describieron Hymas y colaboradores [127]. Cada muestra se introduce por duplicado en un termociclador a tiempo real *Rotor-Gene 3000* (Corbet Research, Sydney, Australia).

El programa de PCR que se emplea consta de los siguientes pasos:

1. Preincubación a 95°C durante 15 min: con la finalidad de activar la polimerasa *AmpliTaq Gold*.
2. Calentamiento a 95°C durante 15 seg.
3. Bajada de temperatura a 58°C durante 1 min.

Los pasos 2 y 3 se repiten un total de 45 ciclos y se añade un control negativo, que contiene los mismos reactivos que las demás muestras analizadas pero carece de DNA.

Para el análisis de los resultados el aparato dispone de un software específico. Se representa la fluorescencia emitida por cada muestra frente al número de ciclo de la PCR y se registra el momento en el cual dicha fluorescencia sobrepasa un umbral crítico. El número de ciclo en el que esto ocurre es una medida de la cantidad de ácido nucleico viral presente en la muestra. Para calcular al final el número de copias de DNA que existen se genera una curva patrón a partir de cantidades conocidas (5, 50, 500 y 5000 copias) de DNA aislado y cuantificado procedente de viriones de HHV-6B (ABI. *Advanced Biotechnologies Inc*, Columbia, USA).

Como último paso y para distinguir el subtipo de HHV-6 (A ó B) de las muestras que resultan positivas en la primera PCR estas se someten a un ensayo TaqMan específico para cada uno de ellos. La variante A es la específica de la EM. Este análisis se ha efectuado en un conjunto de casi 400 individuos sanos (que no han sido incluidos en este estudio) sin que ninguno fuera positivo para HHV-6A.

- Polimorfismos estudiados en los genes candidatos

MHC2TA

- rs4774 (C__381733_10) Assay-on-Demand: variante localizada en la posición 1614 de la región codificante, en el exón 11. Cambio G/C

- rs3087456 (C__15793789_10) Assay-by-Design: polimorfismo que se encuentra en posición -168 del promotor III del gen. Cambio A/G.

EBF1

- D5S2038: microsatélite dinucleotídico (CA)_n que se encuentra en el intrón 6 del gen. La temperatura de *annealing* de los *primers* utilizados para su amplificación es de 56°C, y la secuencia de los mismos es:
 - *Forward*: 5' FAM-GTT CAA ATC TTG CCT TTG CC-3'
 - *Reverse*: 5'-GCC ATT GCT TTG TTT ATG CA-3'
- rs1368297 (C__2085085_10) Assay-on-Demand: SNP situado en el intrón 7. Cambio A/T.

FcRL3

- rs7528684 (C__1741825_10) Assay-on-Demand: SNP localizado en la posición -169 de la región promotora del gen. Cambio T/C.
- rs11264799 (C__1741826_10) Assay-on-Demand: SNP localizado en la posición -110 de la región promotora del gen. Cambio G/A

IL4

- rs2070874 (C_16176215_10) Assay-on-Demand: polimorfismo situado en la posición +33 del exón 1 del gen. Cambio C/T.

- VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) situado a 709 nucleótidos del inicio del intrón 3. La amplificación se realizó a una temperatura de *annealing* de 55°C con los siguientes *primers*:

Forward: 5'-FAM-TAG GCT GAA AGG GGG AAA GC-3'

Reverse: 5'-CTG TTC ACC TCA ACT GCT CC-3'.

IFNG

- INFG: microsatellite dinucleotídico (CA)_n del primer intrón del gen amplificado a una temperatura de *annealing* de 60°C y utilizando los siguientes *primers*:

Forward: 5'-AGA CAT TCA CAA TTG ATT TTA TTC-3'

Reverse: 5'-CCT TCC TGT AGG GTA TTA TTA TAC-3'

OPN

- rs1126616 (C__1840818_10) Assay-on-Demand: SNP situado en la posición +795 desde el punto de inicio de la transcripción en el exón 7. Cambio C/T.

MIF

- rs755622 (C___2213785_10) Assay-on-Demand: SNP localizado en el promotor en posición -173. Se trata de una transición C/G. El análisis de este polimorfismo incluye pequeñas variaciones en la PCR a tiempo real, que se detallan en la **Figura 13**.

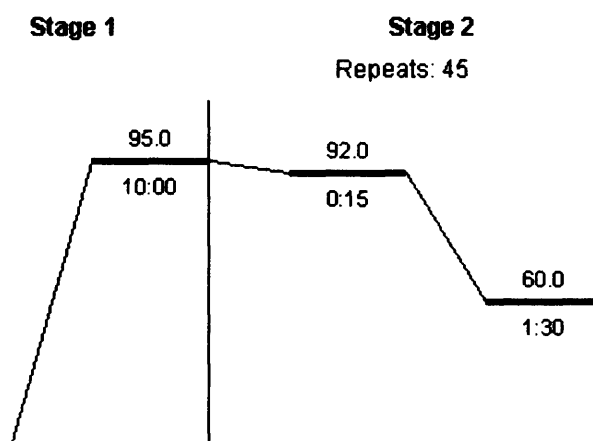


Figura 13. Condiciones de la PCR a tiempo real empleada en el análisis del SNP - 173C/G. Difiere de las condiciones estándar en la temperatura de desnaturalización a 92°C, 30 seg más de elongación a 60°C, y consta de 5 ciclos más de lo habitual. Además, el calentamiento previo de 2 min a 50°C está ausente.

- Microsatélite tetranucleotídico (CATT)_n situado en el promotor en la posición -794.

NOS2A

- rs2779251 (C_15932163_10) Assay-on-Demand: polimorfismo de un sólo nucleótido situado en el promotor del gen. Cambio C/T
- NOS2 (rs3833912): microsatélite pentanucleotídico (CCTTT)_n del promotor a unas 2,6 Kb del sitio de inicio de la transcripción, amplificado con los *primers*:

Forward: 5'-FAM-ACC CCT GGA AGC CTA CAA CT-3'

Reverse: 5'-GCC ACT GCA CCC TAG CCT GTC TCA-3'

- NOS2A (rs12720460): inserción/delección bialélica del tetranucleótido (TAAA) 4 ó 3 veces respectivamente, que se encuentra situado en el promotor del gen y a unas 0,7 Kb del sitio de inicio de la transcripción.

Forward: 5'-HEX-TGG TGC ATG CCT GTA GTC C-3'

Reverse: 5'-GAG GCC TCT GAG ATG TTG GTC-3'

- rs2779248 (C_2593688_10) Assay-on-Demand: polimorfismo de un sólo nucleótido situado en el promotor del gen. Cambio A/G.
- rs1137933 (C_1748185_1) Assay-on-Demand: polimorfismo de un sólo nucleótido situado en el exón 11 del gen. Cambio C/T
- rs2297518 (C_11889257_10) Assay-on-Demand: polimorfismo de un sólo nucleótido situado en el exón 17 del gen. Cambio C/T.

▪ ESTUDIOS REALIZADOS

○ Estudio Caso-Control

Mediante este estudio se compara la distribución de la frecuencia de un factor considerado de riesgo en un grupo de enfermos (en nuestro caso de EM) con la existente en otro grupo de sanos (grupo control). Previamente a esta comparación tendríamos que cerciorarnos de que las frecuencias obtenidas en nuestro grupo de sanos hacen que cumpla la ley de Hardy-Weinberg y se encuentre en equilibrio. Las frecuencias comparadas entre ambos grupos pueden ser genotípicas, alélicas y de portadores.

○ Estudio o Test de Desequilibrio de Transmisión (TDT)

Uno de los inconvenientes que aparecen cuando se comparan dos poblaciones independientes, siendo una de ellas el objeto de estudio y la otra una población que

sirve de control (estudio Caso-Control) es la imposibilidad de determinar si existe una estratificación en alguna de ellas. Por estratificación nos referimos a la falta de homogeneidad en la composición genética de una población. Esa falta de homogeneidad puede estar originada por la existencia de, al menos, dos subpoblaciones étnicamente diferentes que podrían presentar distinta susceptibilidad a la enfermedad y cuyas frecuencias génicas para el *locus* estudiado fueran diferentes. Si ese fuera el caso no sería correcto comparar los enfermos frente a los controles ya que las dos poblaciones no estarían emparejadas. Eso es lo que sucede cuando hay fenómenos de migración, o se producen otros efectos, como sucede con la consanguinidad, que alteran las frecuencias génicas en las poblaciones.

Una manera de solventar este inconveniente es utilizar otro tipo de estudio que compara la información genética obtenida de tríos, es decir, del enfermo y sus dos progenitores sanos. Poniendo por caso el análisis de un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el que podemos encontrar dos variantes o alelos, llevaríamos a cabo el genotipaje de los tres individuos de cada familia o trío con el fin de conocer qué alelos tiene cada uno de los padres y cuál de ellos se transmite a su hijo enfermo. Tan solo podremos utilizar la información que aporten los progenitores que no sean homocigotos, ya que en ese caso el alelo Transmitido y No Transmitido sería el mismo y se anularía la información aportada por ese familiar. Una vez analizados todos los tríos y establecidos cuántos son los alelos que se transmiten (Transmitidos) y los que no se transmiten (No Transmitidos) de cada una de las dos variantes a los individuos enfermos, se observa si esa transmisión es equitativa o si, por el contrario, alguno de los dos alelos resulta con mayor frecuencia Transmitido y por tanto aparece más en los enfermos. El método empleado para ver si esa transmisión está alterada es el cálculo de la probabilidad basada en la distribución binomial, con $p = q = 0.5$, es decir, bajo la

hipótesis nula, es igual de probable que un alelo se transmita como que no se transmita. Mediante un pequeño programa de elaboración propia se obtiene el valor de la probabilidad, que en caso de ser inferior a 0,05 indica que la transmisión no es igual para los dos alelos y existen diferencias significativas en dicha transmisión. Ello sugeriría que uno de los alelos pasa desde los padres sanos a los hijos enfermos con una mayor frecuencia de la esperada y que los enfermos pueden serlo por presentar ese alelo o algún otro asociado a él. En caso de que un alelo no estuviera asociado con una enfermedad se esperaría que el número de veces que se transmite a la descendencia fuera similar al número de veces que no se transmite ($p > 0,05$).

En el caso de analizar un polimorfismo con más de dos alelos (ej. A, B y C) se procedería de la misma forma estableciendo cuántos son los alelos Transmitidos y cuántos los No Transmitidos para el alelo A, para el alelo B y lo mismo para el alelo C. Posteriormente calcularíamos la binomial para cada una de las tres variantes y veríamos si en alguna de ellas la transmisión de los padres a los enfermos está alterada y aparece con mayor frecuencia en estos últimos.

Con estos estudios TDT se puede considerar que se están comparando dos poblaciones, una de ellas compuesta por alelos Transmitidos y que actúa como “Caso” y la otra compuesta por alelos No Transmitidos que actuaría como “Control”. Por cada uno de los alelos del conjunto de los Transmitidos existe otro en el de los No Transmitidos que procede de la misma persona y por ello se considera que ambas “poblaciones” están perfectamente emparejadas y que no existe heterogeneidad entre ellas. De esta manera se eliminan los inconvenientes que pueden surgir de la comparación de dos poblaciones en la que una de ellas no sea uniforme, como son que no se encuentren diferencias entre ellas (falso negativo) o por el contrario, que sí se encuentren cuando en realidad no existen (falso positivo).

- Estudio de Haplotipos

Para el estudio de los haplotipos usamos el algoritmo de Expectación-Maximización contenido en el software Arlequin© v2.000, que estima los diferentes haplotipos presentes en una población así como sus frecuencias a partir de los datos que obtenemos al analizar las muestras. Este algoritmo tiene establecido el número de iteraciones en 5000 partiendo de 50 condiciones iniciales diferentes, y un valor de ϵ de 10^{-7} . La comparación entre los haplotipos hallados en enfermos y los hallados en controles se efectuó mediante una Chi-cuadrado global.

- Análisis Estadístico

La comparación en los estudios caso-control se llevaron a cabo mediante tablas de contingencia 3x2 para comparaciones de frecuencias genotípicas y de 2x2 para las alélicas. Para el cálculo de la probabilidad aplicamos un test de Chi-cuadrado (χ^2) o bien el test exacto de Fischer en el caso de que al menos uno de los valores esperados sea menor de 5 escogiendo en este último el valor de probabilidad de dos colas ya que partimos del supuesto de que existen diferencias entre los casos y los controles sin presuponer en qué sentido. Los intervalos de confianza de las Odds Ratio (OR) al 95% se estimaron con el método de Cornfield, o en caso necesario, se determinaron sus límites exactos.

Todos estos cálculos se realizaron con el paquete informático de análisis estadístico Epi Info v6.02[®] (CDC, Estados Unidos/ WHO, Suiza).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. MHC2TA

Estudiamos el SNP rs3087456 A/G, en posición -168, localizado en el promotor específico de células B (pIII) del gen *MHC2TA*, en nuestros grupos de enfermos de Esclerosis Múltiple y controles. En la población sana encontramos una frecuencia del alelo minoritario de más del 24% (**Tabla 3**). Las frecuencias de los genotipos en nuestra población control se hallaban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo promotor rs3087456A/G en enfermos de EM y en controles.

MHC2TA rs3087456	Enfermos EM (n=396)	Controles (n=519)
AA	203 (51 %)	296 (57%)
AG	168 (42%)	192 (37%)
GG	25 (6,3%)	31 (6,0%)
A	574 (73%)	784 (76%)
G	218 (27%)	254 (24%)

No se encontraron diferencias significativas entre los enfermos y los controles al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas en uno y otro grupo para este marcador.

Con la finalidad de ampliar el estudio, incluimos otro polimorfismo situado en el exón 12: el SNP rs4774 G/C. Este marcador no mostró asociación con la enfermedad en nuestra población (**Tabla 4**).

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo exónico rs4774 G/C en enfermos de EM y en controles.

MHC2TA rs4774	Enfermos EM (n=396)	Controles (n=509)
GG	225 (57%)	284 (56%)
GC	146 (37%)	192 (38%)
CC	25 (6,3 %)	33 (6,5%)
G	596 (75%)	760 (75%)
C	196 (25%)	258 (25%)

La inclusión de este segundo polimorfismo en el estudio nos permitió establecer los haplotipos definidos por ambos marcadores. La asignación de dichos haplotipos puede realizarse mediante el recuento directo, con la única duda en los dobles heterocigotos. En este caso, una forma efectiva y más exacta de estimar las frecuencias de los haplotipos es la utilización del algoritmo EM contenido en el software Arlequin (véase apartado “Pacientes, Materiales y Métodos”). Con este método las frecuencias estimadas son más fiables que las calculadas mediante recuento “manual”. Al comparar globalmente las frecuencias de los haplotipos de los enfermos de EM totales con las de los controles se observó una tendencia a la asociación ($p = 0,098$; $\chi^2=6,3$) como se puede observar con los datos recogidos en la **Tabla 5**. Al analizar cada uno de los haplotipos por separado se encontró que uno de ellos, el haplotipo A/C, parecía tender a la asociación confiriendo protección a padecer Esclerosis Múltiple ($p = 0,08$; OR = 0,83 [0,63- 1,04]) mientras que el haplotipo G/C se asociaba a la enfermedad en sentido opuesto confiriendo susceptibilidad ($p = 0,047$; OR = 1,49 [1,10]). Estos resultados se dirigen en el mismo sentido que los obtenidos en el caso de la Artritis Reumatoide, otra enfermedad multifactorial de alto componente inflamatorio.

Tabla 5. Frecuencias haplotípicas resultantes de la combinación rs3087456 / rs4774 estimadas con el algoritmo de Expectación-Maximización en el grupo de enfermos de EM totales, EM *DRB1*1501*⁺ EM *DRB1*1501*⁻ y en el de controles.

Haplotipos rs3087456/rs4774	Enfermos EM (2n=792)	EM <i>DRB1*1501</i> ⁺ (2n=284)	EM <i>DRB1*1501</i> ⁻ (2n=494)	Controles (2n=988)
A/G	435 (55%)	162 (57%)	266 (54%)	544 (55%)
A/C	137 (17%)	54 (19%)	84 (17%)	203 (21%)
G/G	161 (20 %)	53 (19%)	104 (21%)	192 (19%)
G/C	57 (7,2%)	15 (5,3%)	40 (8,0%)	49 (4,9%)

La estratificación del grupo de enfermos atendiendo a la presencia/ausencia del alelo de MHC de clase II, *DRB1*1501*, no mostró diferencias significativas ($p>0,05$) tanto en las frecuencias de cada uno de los marcadores analizados por separado como en el conjunto de los haplotipos obtenidos con ambos marcadores (**Tabla 5**). Así mismo, no se observaron diferencias en los pacientes tras dividirlos según el género y la clínica.

El estudio TDT realizado con los tríos disponibles no evidenció una transmisión de padres sanos a hijos enfermos distorsionada ($p>0,05$) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Haplotipos Transmitidos y No Transmitidos de los padres sanos a sus hijos enfermos y su probabilidad.

rs3087456/rs4774	Transmitidos	No Transmitidos	p
A/G	43	43	0,54
A/C	13	12	0,65
G/G	16	10	0,16
G/C	4	11	0,06

2. *MHC2TA* y la infección por HHV-6A

Las **Tablas 7 y 8** recogen la distribución de los polimorfismos rs3087456 A/G y rs4774 G/C del gen *MHC2TA* tanto en los pacientes con replicación activa del HHV-6A (HHV-6A positivos) como en los enfermos de EM sin esa replicación activa (HHV-6A negativos). El grupo de los controles se incluyó en este estudio únicamente con fines comparativos.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas en enfermos HHV-6A positivos y negativos y en controles del SNP rs3087456 A/G.

	GENOTIPOS			ALELOS	
	AA	AG	GG	A	G
EM HHV-6A positivos (n=21)	7 (33%)	14 (67%)	0	28 (67%)	14 (33%)
EM HHV-6A negativos (n=75)	43 (57%)	30 (40%)	2 (2,7%)	116 (77%)	34 (23%)
Controles (n=519)	296 (57%)	192 (37%)	31 (6,0%)	784 (76%)	254 (24 %)

La comparación de las frecuencias de los genotipos y de los alelos del polimorfismo rs3087456 A/G entre los dos grupos de enfermos, HHV-6A positivos y HHV-6A negativos, y de cualquiera de estos dos con el grupo de los controles no reveló ninguna diferencia significativa.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas en enfermos HHV-6A positivos y negativos y en controles del SNP rs4774 G/C.

	GENOTIPOS			ALELOS	
	GG	GC	CC	G	C
EM HHV-6A positivos (n=22)	5 (23%)	13 (59%)	4 (18%)	23 (52%)	21 (48%)
EM HHV-6A negativos (n=77)	50 (65%)	25 (32%)	2 (2,6%)	125 (81%)	29 (19%)
Controles (n=499)	278 (56%)	188 (38%)	33 (6,6%)	744 (75%)	254 (25%)

Encontramos diferencias estadísticas altamente significativas en el caso de las frecuencias alélicas del polimorfismo exónico rs4774 cuando ambos grupos de enfermos se compararon ($p = 0,0001$; OR = 3,94 (1,81-8,58)). Al comparar las frecuencias alélicas de ese mismo polimorfismo, rs4774, del grupo de los enfermos HHV-6A positivos frente a las frecuencias observadas en el grupo de los controles, se observaron diferencias muy significativas ($p = 0,001$, OR = 2,67 (1,40-5,11)). Por el contrario, la comparación de las frecuencias alélicas entre los enfermos HHV-6A negativos y el grupo de los controles puso de manifiesto la similitud de dichas frecuencias en los dos grupos ($p = 0,08$, OR = 0,68 (0,43-1,06)), poniendo de manifiesto que los enfermos de EM sin replicación viral activa en suero se parecen más al grupo de individuos sanos que al de los otros enfermos de EM.

Posteriormente estudiamos las combinaciones genotípicas formadas por los dos SNPs que estaban en moderado desequilibrio de ligamiento en nuestra población ($D' = 0,25$; $p = 0,009$). El análisis multivariante sugirió que el efecto se debía principalmente

al SNP rs4774, más que al rs3087456. Asimismo, los haplotipos estimados por el algoritmo EM no aportaron información adicional a la proporcionada por el polimorfismo rs4774 por sí solo, aunque dado el modesto desequilibrio de ligamiento entre los dos marcadores esa estimación podría ser imprecisa.

3. *EBF1* (Early B-cell Factor)

Dado que los microsatélites son marcadores genéticos muy informativos, seleccionamos dentro del gen *EBF1* el microsatélite D5S2038. Vimos su distribución alélica y realizamos un estudio caso-control con 356 enfermos de Esclerosis Múltiple y 540 controles sanos. Los resultados están reflejados en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Frecuencias alélicas del microsatélite D5S2038 en los enfermos de EM y en los controles.

<i>EBF1</i> D5S2038	Enfermos EM (n=356)	Controles (n=540)	p
1	2	2	0,99
2	15	27	0,58
3	36	55	0,97
4	176	272	0,78
5*	183	246	0,08
6	81	119	0,80
7	47	79	0,54
8	94	146	0,83
9	7	8	0,57
10	4	7	1,00
11	0	3	0,28

*p = 0,08; OR(95%CI) = 1,26 (0,96-1,67)

Como se aprecia, el único alelo que mostró una cierta tendencia a la asociación fue el alelo 5, mientras que en ninguno de los otros diez alelos se encontraron diferencias significativas al comparar sus distribuciones en los enfermos y en los controles.

Así mismo, tras realizar una estratificación del conjunto de enfermos según la forma clínica que éstos presentaban (EM-PP vs EM-RR/SP) tampoco se observaron diferencias en las distribuciones alélicas del microsatélite en ambos grupos.

Considerando los resultados vistos en el estudio caso-control llevamos a cabo un estudio en familias para tratar de definir el papel de este marcador en la enfermedad. Con los 51 tríos completos, cada uno de ellos compuesto por el enfermo de EM y sus progenitores, se realizó un Test de Desequilibrio de Transmisión (TDT), viendo en este caso una herencia distorsionada del mismo alelo que en estudio caso-control tendía a la asociación (ver **Tabla 10**).

Tabla 10. Test de desequilibrio de Transmisión (TDT) del microsatélite D5S2038 situado en el gen *EBF1* en los tríos (enfermos de EM y sus dos progenitores).

<i>EBF1</i> D5S2038	Transmitidos	No Transmitidos	p
3	5	9	0,91
4	23	11	0,44
5	28	15	0,03
6	3	8	0,96
7	3	7	0,94
8	11	10	0,50
9	0	2	1,00
10	1	1	0,75

A la vista de estos resultados decidimos ampliar el estudio incorporando otro polimorfismo del gen *EBF1* en busca de más evidencias que apoyaran la asociación de este gen con la Esclerosis Múltiple. Para ello escogimos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) situado en un intrón del gen (rs1368297). Los datos correspondientes a las frecuencias alélicas y genotípicas están recogidos en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs1368297 A/T del gen *EBF1* en los enfermos de Esclerosis Múltiple y en los controles.

<i>EBF1</i> rs1368297	AA	AT	TT	A	T
Enfermos EM (n=351)	125 36%	168 48%	58 16%	418 60%	284 40%
Controles (n=524)	149 28%	267 51%	108 21%	565 54%	483 46%

AA vs (AT+TT): $p = 0,02$; OR (95%CI)= 1,39 (1,03-1,88).

A vs T: $p = 0,02$; OR (95%CI)= 1,26 (1,03-1,53).

El alelo A se encontró aumentado en el grupo de enfermos de manera significativa al compararlos con controles. Bajo un modelo de herencia recesiva, la presencia del genotipo correspondiente al homocigoto del alelo más frecuente, el AA, resultó ser un factor de predisposición a la enfermedad. Más aún, la relación entre el genotipo de riesgo y el genotipo del homocigoto que no confería riesgo (AA:TT) es significativamente mayor en el caso de los enfermos que en el de los controles ($p = 0,03$; OR (95%CI) = 1,38 (1,03-1,84)).

En un análisis más profundo, nos fijamos en el grupo de enfermos de Esclerosis Múltiple que presentaban el alelo de HLA, ya conocido factor de susceptibilidad, *DRB1*1501*. Al comparar los dos subgrupos entre sí vimos que no existían diferencias en las frecuencias genotípicas ni alélicas, aunque se podría considerar que había una tendencia a la significación. Sí se observaron diferencias entre los enfermos

*DRB1*1501*⁺ y los controles: la diferencia hallada entre estos dos grupos era más patente que en el análisis previo con el grueso de los pacientes (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP del gen *EBF1* (rs1368297) en los enfermos de Esclerosis Múltiple estratificados por el alelo *DRB1*1501*.

<i>EBF1</i> rs1368297	AA	AT	TT	A	T
Enfermos EM <i>DRB1*1501</i> ⁺ (n=123) ¹	51 42%	53 43%	19 15%	155 63%	91 37%
Enfermos EM <i>DRB1*1501</i> ⁻ (n=228)	74 33%	115 50%	39 17%	263 58%	193 42%
Controles (n=524)	149 28%	267 51%	108 21%	565 54%	483 46%

¹ Enfermos *DRB1*1501*⁺ vs Controles → AA vs (AT+TT): p = 0,005; OR (95%CI) = 1,78 (1,16-2,73); A vs T: p = 0,01; OR (95%CI) = 1,46 (1,08-1,96).

Finalmente, cuando la aparición simultánea de ambos alelos de susceptibilidad, D5S2038*5 y *EBF1* rs1368297*A, se comparó en los enfermos frente a la que se daba en los controles se vio que había un mayor número de aquellos que presentaban esa combinación, siendo ese aumento significativo (p = 0,03; OR (95%CI) = 1,38 (1,03-1,84)).

4. *FcRL3* (*Fc Receptor Like-3*)

Como se muestra en las **Tablas 13 y 14**, la comparación global en una tabla 3x2 de las frecuencias genotípicas entre nuestro grupo de enfermos y el de los controles mostró diferencias significativas en el caso del SNP situado en -169T/C, pero no para el localizado en posición -110G/A. Igualmente, estos resultados reflejan las diferencias existentes al comparar las frecuencias alélicas del polimorfismo asociado entre enfermos y controles [T vs. C: $p = 0,012$; OR = 1,27 (1,05-1,54)].

Tabla 13. Frecuencias genotípicas del marcador del promotor de *FcRL3* -169T/C en nuestros grupos de enfermos de EM y de Controles y en los enfermos de EM según si presentan o no el alelo *DRB1*1501*.

-169T/C FcRL3	Controles (n=508)	Enfermos EM (n=400)	Enfermos EM <i>DRB1*1501</i> ⁺ (n=145)	Enfermos EM <i>DRB1*1501</i> ⁻ (n=249)
TT	157 (31%)	145 (36%)	51 (35%)	92 (37%)
TC	245 (48%)	197 (49%)	75 (52%)	119 (48%)
CC	106 (21%)	58 (15%)	19 (13%)	38 (15%)

Comparación global EM vs Controles: $p = 0,03$; $\chi^2=6,99$
(TT+TC) vs CC: $p = 0,013$; OR = 1,55 (1,08-2,54)

Tabla 14. Frecuencias genotípicas del marcador del promotor de *FcRL3* -110G/A en nuestros grupos de enfermos de EM y de Controles y en los enfermos de EM según si presentan o no el alelo *DRB1*1501*.

-110G/A FcRL3	Controles (n=507)	Enfermos EM (n=399)	Enfermos EM <i>DRB1*1501</i> ⁺ (n=142)	Enfermos EM <i>DRB1*1501</i> ⁻ (n=251)
GG	243 (48%)	214 (54%)	72 (50%)	140 (56%)
GA	215 (42%)	151 (38%)	57 (41%)	90 (36%)
AA	49 (9,7%)	34 (8,5%)	13 (9,0%)	21 (8,4%)

Comparación global EM vs Controles: $p = 0,264$; $\chi^2=2,66$

La estratificación por el principal factor genético de susceptibilidad (*HLA-DRB1*1501*) no reveló ninguna asociación preferencial de alguno de los marcadores con cualquiera de los dos subgrupos.

En un segundo paso, procedimos al recuento de los haplotipos provenientes de la combinación de los dos marcadores y observamos que aquellos haplotipos marcados por el alelo *-169*T*, que en este caso y debido al elevado desequilibrio de ligamiento quedan reducidos al haplotipo *-169*T / -110*G*, eran más frecuentes en el grupo de enfermos de Esclerosis Múltiple que en el de controles sanos (**Tabla 15**).

Tabla 15. Haplotipos resultantes de la combinación *-169T/C // -110G/A* presentes en nuestra población.

Haplotipos	Controles (n=994)	Enfermos EM (n=790)	Enfermos EM <i>DRB1*1501</i> ⁺ (n=284)	Enfermos EM <i>DRB1*1501</i> ⁻ (n=494)
TG	552 (56%)	480 (61%)	173 (61%)	300 (61%)
CA	303 (30%)	217 (27%)	83 (29%)	130 (26%)
CG	139 (14 %)	93 (12%)	28 (9,8%)	64 (13%)

Enfermos EM vs Controles: *-169*T// -110*G*: p = 0,026; OR = 1,24 (1,02-1,51).

5. Interleuquina 4 (*IL4*)

En el año 2003, Kantarci y colaboradores describieron un desequilibrio de ligamiento muy fuerte entre el SNP situado en posición +33 del primer exón del gen de *IL4* y otros tres polimorfismos del mismo gen [68]. En nuestro caso al calcular los parámetros de desequilibrio de ligamiento observamos que entre los dos marcadores que hemos estudiado, el SNP del exón 1 y el VNTR situado a 709 nucleótidos del comienzo del intrón 3, se obtiene una $D' = 0,93$ y una $r^2 = 0,85$ lo que indica un desequilibrio de ligamiento muy fuerte con una equivalencia del 96% en nuestra población control. Debido a este elevadísimo desequilibrio de ligamiento existente en la población española entre los dos marcadores estudiados nos referiremos únicamente a los datos obtenidos para el SNP.

Los datos correspondientes al genotipado del polimorfismo exónico (rs2070874) están recogidos en la **Tabla 16**. Cuando comparamos las frecuencias genotípicas globalmente de los enfermos frente a las de los controles observamos diferencias significativas ($p = 0,011$; $\chi^2 = 9$). Dicha diferencia surge principalmente por la disminución apreciable de los heterocigotos en el grupo de los enfermos, siendo en este grupo del 18% frente al 28% presente en controles ($p = 0,003$; OR (95%CI) = 0,57 (0,38-0,84)).

Tabla 16. Frecuencias genotípicas, alélicas y de los portadores para el SNP +33C/T (rs2070874) del exón 1 del gen *IL4* en enfermos de Esclerosis Múltiple y en los controles.

		EM (n=305)	Controles (n=354)	p	OR (95%CI)
Genotipos*	CC	241 (79%)	249 (70%)	0,011	1,59 (1,09-2,31)
	CT	54 (18%)	97 (28%)	0,003	0,57 (0,38-0,84)
	TT	10 (3,3%)	8 (2,3%)	0,42	1,47 (0,53-4,13)
Alelos	C	536 (88%)	595 (84%)	0,047	0,73 (0,52-1,01)
	T	74 (12%)	113 (16%)		
Portadores	C	295 (97%)	346 (98%)	0,057	0,71 (0,5-1,03)
	T	64 (21%)	105 (30%)		

*Comparación global de los genotipos de enfermos vs controles: $p = 0,011$, $\chi^2 = 9$.

A la vista de estos resultados, ser heterocigoto protege frente a la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple, ya que los homocigotos TT aparecen con una frecuencia que no es significativamente diferente a la hallada en el grupo de los controles. Comparando las frecuencias alélicas en enfermos frente a controles apreciamos una disminución marginalmente significativa del alelo +33*T en los pacientes ($p = 0,047$; OR = 0,73 (0,52-1,01)) debida fundamentalmente a esa disminución de los heterocigotos en ese grupo.

Posteriormente procedimos, como en otros casos, a estratificar nuestro grupo de pacientes por el principal factor genético de susceptibilidad, el alelo *DRB1*1501*. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas al comparar los enfermos *DRB1*1501*⁺ vs *DRB1*1501*⁻ ($p = 0,26$, $\chi^2 = 2,69$) ni al comparar los enfermos *DRB1*1501*⁺ vs controles sanos ($p = 0,58$; $\chi^2 = 1,06$) lo cual sugiere que ambos *loci* actúan de manera independiente.

Así mismo, tampoco vimos diferencias según la edad de debut de los pacientes (la edad media de debut de los enfermos era de 27 años en los tres genotipos). Al estratificar el grupo de los enfermos según la forma clínica que presentaban no encontramos una clara asociación en el grupo compuesto por los enfermos que se clasificaban dentro de las formas Primarias-Progresivas frente al conjunto de los que tenían EM Remitente-Recurrente y Secundaria-Progresiva. A pesar de no obtener diferencias significativas no pudimos sacar conclusiones dado que el grupo de enfermos con forma EM-PP es muy reducido y entre los genotipos obtenidos en ellos no había ningún homocigoto TT (genotipos CC: CT: TT – 21:5:0).

6. Interferón-gamma (*IFNG*)

Comparamos las frecuencias alélicas, genotípicas y fenotípicas (*carriers*) obtenidas para el microsatélite IFNG estudiado en el gen *IFNG* en los enfermos de EM y en los controles. No encontramos diferencias significativas en ninguno de los casos, inclusive tras estratificar el grupo de nuestros enfermos atendiendo al principal alelo de susceptibilidad a la EM, *DRB1*1501*, a la forma clínica presentada y al sexo. Los datos de las frecuencias alélicas del microsatélite en enfermos y en controles están recogidos en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Frecuencias alélicas de los distintos alelos hallados para el microsatélite IFNG en enfermos de EM y Controles.

Alelos	EM (2n=686)	Controles (2n=1060)
11	1 (0,1%)	2 (0,2%)
12	325 (47%)	476 (45%)
13	296 (43%)	471 (44%)
14	34 (5,0%)	58 (5,5%)
15	27 (3,9%)	48 (4,5%)
16	0	1 (0,1%)
17	3 (0,4%)	4 (0,4%)

Relación con tratamiento con IFN- β :

En un segundo abordaje del estudio de este gen y su papel en la EM, buscamos la relación entre este marcador genético y la aparición o ausencia de brotes dentro de los dos años posteriores al tratamiento con IFN- β .

En este estudio incluimos 110 enfermos de Esclerosis Múltiple cuya forma clínica se había clasificado como Remitente-Recurrente (EM-RR) y que estaban siendo tratados desde hacía al menos dos años con IFN- β . De ellos, 25 recibían IFN- β 1a intramuscular (Avonex®), 49 recibían IFN- β 1b subcutáneo (Betaferon®) y los 36 restantes estaban siendo tratados con IFN- β 1a subcutáneo (Rebif®).

Setenta y un pacientes tuvieron al menos un brote durante los primeros dos años de tratamiento mientras que los 39 restantes no presentaron ninguno durante dicho periodo. Entre ambos grupos no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad ni a la proporción de sexos. Las características demográficas básicas tanto de los enfermos clasificados como respondedores como de los no respondedores al tratamiento están resumidas en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Características básicas de los enfermos de Esclerosis Múltiple respondedores y no respondedores.

	Respondedores n = 39	No-respondedores n = 71	p
Edad, media (DE)	40años (8,39)	38años (7,9)	0,13
Mujeres (%)	56,4	64,8	0,38
Duración enfermedad, media (DE)	5,2años (4,6)	4,8años (3,9)	0,65
EDSS, mediana (P25-P75)	2 (1-3)	2 (1-3)	0,56
Brotos en los 2 años previos, media (DE)	2,6 (1,5)	3,0 (1,3)	0,09
Tipo de IFN- β (%)			
IFN- β 1a IM	23	24	0,81
IFN- β 1b SC	46	44	
IFN- β 1a SC	32	31	

IM: Intramuscular; SC: Subcutáneo

Al analizar el microsatélite del gen *IFNG* encontramos 4 alelos numerados del 12 al 15 conforme a la literatura previa siendo dos de ellos de baja frecuencia. La

distribución alélica en ambos grupos de enfermos está recogida en la **Tabla 19**. Además, se incluye la información correspondiente a un grupo de controles sanos que fueron tipados con fines comparativos. Dado que en esta tabla se compararon los alelos de manera global, no fue necesario corregir por Bonferroni.

Tabla 19. Comparación global de los alelos del microsatélite IFNG en los pacientes Respondedores y en los No respondedores al tratamiento con IFN- β .

Alelo	No-Respondedores	Respondedores	Controles
12	52	42	496
13	77	31	483
14	11	0	60
15	0	5	50

a) Respondedores vs No-respondedores: $p = 0,0005$.

b) Respondedores vs controles sanos: $p = 0,1$

c) No-respondedores vs controles sanos: $p = 0,005$

Al observar la distribución alélica de los controles, se advierte que la proporción de cada uno de los alelos del microsatélite en este grupo es muy similar a la obtenida en el grupo de los enfermos Respondedores. La comparación de cada uno de los alelos entre los dos grupos de enfermos se recoge en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Comparación uno por uno de los alelos del microsatélite IFNG en los enfermos Respondedores (2n=78) y No-respondedores (2n=142).

Alelo	No-respondedores	Respondedores	p	OR (95%CI)
12	52	42	0,013	0,5 (0,3-0,9)
13	77	31	0,040	1.8 (1,0-3,3)
14	11	0	0,009	ND
15	0	5	0,005	0 (0-0,58)

Curiosamente, vimos que todos los alelos se encontraban distribuidos de manera asimétrica. La relación entre los alelos menos frecuentes era radicalmente opuesta en el caso de los enfermos Respondedores (0/11) a la encontrada en los No-respondedores (5/0) obteniéndose una diferencia altamente significativa ($p = 0,0002$). Incluso en el caso de que hubiéramos excluido esos alelos tan infrecuentes (14 y 15) hubiéramos seguido encontrando la misma tendencia en la relación entre los alelos 12 y 13 en Respondedores vs No-respondedores (52/42 vs 77/31, $p = 0,02$).

7. Osteopontina (OPN)

En un trabajo previo estudiamos cuatro polimorfismos pertenecientes al gen de la Osteopontina (OPN) en enfermos de Artritis Reumatoide [128]. Los cuatro SNPs, -327T/C, 795C/T, 1128A/G y 1284A/C formaban dos haplotipos según se había descrito previamente y se vio que presentaban un desequilibrio de ligamiento muy fuerte también en nuestra población. De manera análoga, nosotros encontramos tan sólo dos haplotipos principales cuya suma comprendía más del 95% del total de los haplotipos hallados. Teniendo esto en cuenta, decidimos utilizar la información obtenida del tipaje de tan sólo uno de esos SNPs, el 795C/T, que resultaba casi tan informativo como el haplotipo completo.

En la **Tabla 21** se muestra la distribución genotípica en los enfermos de Esclerosis Múltiple y en nuestra población control. Dichas frecuencias genotípicas resultaron encontrarse en equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de los controles. Al realizar la comparación global y de genotipo por genotipo entre ambos grupos no observamos diferencias significativas. Así mismo, tampoco se encontraron diferencias al comparar las frecuencias alélicas o las fenotípicas (*carriers*) entre los dos grupos como se puede calcular a partir de los datos de la **Tabla 21**.

En un segundo análisis, el grupo de los enfermos de EM se estratificó atendiendo a la clínica que presentaban: EM-RR conjuntamente con EM-SP y por otro lado los que presentaban la forma EM-PP, y también estratificamos atendiendo a la presencia o ausencia del alelo *DRB1*1501*. La comparación entre los dos grupos con diferente forma clínica no mostró ninguna diferencia. Tampoco la estratificación según el *DRB1*. De hecho, la distribución de los alelos en los individuos *DRB1*1501* positivos y *DRB1*1501* negativos era similar y también muy parecida a la de los controles, lo que

indica que no hay evidencias de interacción genética entre ambos *loci*. La estratificación por género también se examinó sin encontrar resultados significativos.

Tabla 21. Frecuencias genotípicas del polimorfismo 795C/T en los enfermos de EM, en los enfermos estratificados atendiendo al alelo de *HLA-DR2* y en los controles.

OPN 795C/T	n	CC	CT	TT
Controles	484	224 (46%)	219 (45%)	41 (8,5%)
Enfermos EM	326	158 (48%)	140 (43%)	28 (8,6%)
Enfermos EM <i>HLA-DRB1*1501</i>⁺	118	55 (47%)	50 (42%)	13 (11%)
Enfermos EM <i>HLA-DRB1*1501</i>⁻	205	102 (50%)	89 (43%)	14 (6,8%)

Finalmente incluimos en el estudio un total de 51 tríos de enfermos con sus dos progenitores. Con un estudio TDT tratamos de encontrar alguna diferencia en la transmisión de alguno de los alelos desde los progenitores heterocigotos a la descendencia afectada, pero no detectamos ninguna alteración en dicha transmisión. El alelo más frecuente, 795*C, aparecía transmitido en los enfermos de EM en 23 ocasiones y no transmitido en 18 ($p = 0,27$), no existiendo por tanto diferencias reseñables.

8. Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (*MIF*)

Al analizar ambos marcadores en nuestra población control pudimos comprobar que los dos cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg. El polimorfismo situado en la región promotora -173C/G (rs755622) no mostró diferencias significativas ni en las frecuencias alélicas ni en las genotípicas globalmente cuando se compararon con las halladas en la población control ($p = 0,28$; OR = 1,16 y $p = 0,27$; $\chi^2=2,6$, respectivamente). En el caso de los portadores tampoco se vieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Tras llevar a cabo la estratificación por el alelo *HLA-DRB1*1501* no se observó diferencia en la frecuencias aunque parecía existir una muy ligera tendencia en los portadores del alelo -173*C en los enfermos *DRB1*1501* positivos ($p = 0,11$; OR = 1,38) cuando se compararon con el grupo de los controles. Los datos se pueden deducir de la **Tabla 22**. La estratificación por género de los enfermos reveló las mismas frecuencias en hombres y mujeres sin encontrar, por tanto, diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 22. Frecuencias genotípicas y alélicas para el SNP del promotor del gen *MIF* rs755622 (-173G/C) en el grupo global de los enfermos de EM, en los enfermos *HLA-DRB1*1501* positivos y negativos y en el grupo de los controles.

-173C/G rs755622		EM (n=412)	EM <i>DRB1*1501</i> ⁺ (n=150)	EM <i>DRB1*1501</i> ⁻ (n=256) ¹	Controles (n=546)
Genotipos	GG	301 (73%)	106 (71%)	191 (75%)	420 (77%)
	GC	103 (25%)	40 (27%)	61 (24%)	113 (21%)
	CC	8 (1,9%)	4 (2,6%)	4 (1,6%)	13 (2,4%)
Alelos	G	705 (86%)	252 (84%)	443 (87%)	953 (87%)
	C	119 (11%)	48 (16%)	69 (13%)	139 (13%)

Portadores del alelo -173*C vs. G: $p = 0,17$; OR (95%CI)=1,23 (0,91-1,67)

Para este polimorfismo realizamos además el estudio TDT con los tríos disponibles aunque sin mucho éxito, ya que el alelo *-173*G* se transmitía en 11 de los 17 casos encontrados, sin alcanzar la significación ($p = 0,17$).

Al estudiar el microsatélite (CATT)_n situado en la posición -794 del promotor del gen *MIF* encontramos cuatro alelos diferentes en nuestra población control, llamados (CATT)₅, (CATT)₆, (CATT)₇ y (CATT)₈. El cuarto alelo, (CATT)₈, con una frecuencia muy baja, no fue encontrado en el grupo de los enfermos de EM. Ninguno de estos alelos mostró asociación en las comparaciones genotípicas, alélicas o de portadores entre los enfermos de EM y los controles sanos. Únicamente después de estratificar por el alelo *DRB1*1501*, donde no se observaron diferencias entre los enfermos positivos y negativos para este factor, la frecuencia de los individuos portadores del alelo (CATT)₇ dentro del subgrupo positivo casi era estadísticamente distinta a la hallada en el grupo de los controles ($p = 0,05$; OR = 1,53) como se recoge en la **Tabla 23**. Al igual que en el anterior marcador, el género de los enfermos no varió las proporciones encontradas en el conjunto global (datos no reflejados).

Tal y como sucedía en el caso del SNP, el estudio llevado a cabo en las familias no reveló ninguna distorsión significativa en la transmisión de los alelos encontrados. Los tres alelos encontrados en enfermos y sus familiares presentaron una transmisión equitativa de padres sanos a hijos enfermos.

Tabla 23. Resultados de los genotipos, alelos y portadores del microsatélite del promotor del gen *MIF* (*CATT*)_n en el conjunto global de los enfermos de EM, en los enfermos *HLA-DRB1*1501*⁺ y en el grupo control. Los datos del conjunto de los enfermos *HLA-DRB1*1501*⁻ se incluye como información adicional.

Microsatélite (<i>CATT</i>) _n	Alelo	EM (n=389)	HLA- <i>DRB1*1501</i> ⁺ (n=139)	HLA- <i>DRB1*1501</i> ⁻ (n=245)	Controles (n=534)
Genotipos	5/5	26 (6,7%)	13 (9,4%)	13 (5,3%)	38 (7,1%)
	5/6	126 (32%)	41 (30%)	84 (34%)	177 (33%)
	5/7	19 (4,9%)	5 (3,6%)	14 (5,7%)	20 (3,7%)
	6/6	161 (41%)	53 (38%)	105 (43%)	235 (44%)
	6/7	54 (14%)	25 (18%)	28 (11%)	60 (11%)
	6/8	-	-	-	1 (0,2%)
	7/7	3 (0,8%)	2 (1,4%)	1 (0,4%)	3 (0,2%)
Portadores	5	171 (44%)	59 (42%)	111 (45%)	235 (44%)
	6	341 (88%)	119 (86%)	217 (89%)	473 (89%)
	7	76 (19%)	32 (23%)	43 (18%)	83 (16%)
	8	-	-	-	1 (0,2%)
Alelos	5	197 (25%)	72 (26%)	124 (25 %)	273 (26%)
	6	502 (65%)	172 (62%)	322 (66%)	708 (66%)
	7	79 (10%)	34 (12%)	44 (9,0%)	86 (8,0%)
	8	-	-	-	1 (0,1%)

Se estimaron los haplotipos resultantes de los dos marcadores analizados y se compararon globalmente los de los enfermos de EM frente a los de controles. No se encontraron diferencias significativas (Tabla 24). Sin embargo, al estratificar nuevamente el grupo de los enfermos atendiendo al subtipo de *DR2* y comparar las frecuencias del grupo de los enfermos positivos para el alelo *DRB1*1501* con las de los controles, la del haplotipo (*CATT*)₇ /-173*C estaba ligeramente aumentada en los

primeros confiriendo por tanto susceptibilidad a la EM ($p = 0,046$; $OR = 1,54$), aunque este resultado no permite aplicar la corrección de Bonferroni.

Tabla 24. Frecuencias haplotípicas en el conjunto global de los enfermos de EM, en el subgrupo de los enfermos *HLA-DRB1*1501*⁺ y en el grupo control.

Haplotipos	EM (n=776)	<i>HLA-DRB1*1501</i> ⁺ (n=280)	Controles (n=1052)
5/G	185 (24%)	68 (24%)	257 (24%)
5/C	12 (1,5%)	4 (1,4%)	12 (1,1%)
6/G	475 (61%)	165 (59%)	660 (63%)
6/C	25 (3,1%)	9 (3,2%)	36 (3,4%)
7/G	4 (0,5%)	1 (0,4%)	2 (0,2%)
7/C	75 (9,6%)	33 (12%)	84 (8,0%)
8/C	-	-	1 (0,1%)

9. Oxido Nítrico Sintasa Inducible (*NOS2A*)

Al analizar independientemente los seis polimorfismos de un solo nucleótido, 4 de la zona promotora y 2 de los exones, no observamos diferencias significativas en las frecuencias ni genotípicas ni alélicas entre el grupo de los enfermos de EM y el grupo de los controles (**Tablas 25-30**). Tan sólo se aprecia una levísima tendencia a la asociación del los portadores del alelo (*CCTTT*)₁₀.

Igualmente, la estratificación del grupo de los enfermos según el subtipo del *DR2* y según el género y la forma clínica no arrojó ninguna novedad (datos de género y forma clínica no recogidos).

Tabla 25. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo **rs2779251** del promotor del gen *NOS2A* en el conjunto de los enfermos de EM, en los enfermos *HLA-DRB1*1501⁺* y *HLA-DRB1*1501⁻* y en los controles.

		EM (n=401)	EM <i>DRB1*1501⁺</i> (n=150)	EM <i>DRB1*1501⁻</i> (n=251)	Controles (n=530)
Genotipos	CC	272 (68%)	109 (73%)	163 (65%)	394 (74%)
	CT	114 (29%)	35 (23%)	79 (32%)	124 (23%)
	TT	15 (3,7%)	6 (4,0%)	9 (3,6%)	12 (2,3%)
Alelos	C	658 (82%)	253 (84%)	405 (81%)	912 (86%)
	T	144 (18%)	47 (16%)	97 (19%)	148 (14%)

Tabla 26. Frecuencias de portadores de los distintos alelos del microsatélite **NOS2 (CCTTT)_n** del promotor del gen **NOS2A** en el conjunto de los enfermos de EM, en los enfermos **HLA-DRB1*1501⁺** y **HLA-DRB1*1501⁻** y en los controles.

	EM (2n=782)	EM <i>DRB1*1501⁺</i> (2n=280)	EM <i>DRB1*1501⁻</i> (2n=502)	Controles (2n=946)
7	-	-	-	2 (0,2%)
8	19 (2,4%)	8 (2,9%)	11 (2,2%)	26 (2,7%)
9	35 (4,5%)	12 (4,3%)	23 (4,6%)	45 (4,8%)
10	96 (12%)	33 (12%)	63 (13%)	141 (15%)
11	175 (22%)	61 (22%)	114 (23%)	184 (20%)
12	219(28%)	89 (32%)	130 (26%)	278 (29%)
13	128(16%)	45 (16%)	83 (17%)	150 (16%)
14	63(8,1%)	17 (6,1%)	46 (9,2%)	84 (8,9%)
15	33(4,2%)	8 (2,9%)	25 (5,0%)	24 (2,5%)
16	10 (1,3%)	5 (1,8%)	5 (1,0%)	11(1,2%)
17	4 (0,5%)	2 (0,7%)	2 (0,4%)	-
18	-	-	-	1 (0,1%)

En el caso del microsatélite pentanucleotídico se puede apreciar una muy leve tendencia a la protección frente a la EM ($p = 0,11$; OR = 0,8). Las frecuencias de los demás portadores son muy similares a las halladas en el grupo de los controles. La estratificación por el subtipo de *DR2*, género y forma clínica no mostró distribuciones estadísticamente diferentes en ninguna de las comparaciones realizadas.

Tabla 27. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo **ins/del (rs12720460)** del promotor del gen **NOS2A** en el conjunto de los enfermos de EM, en los enfermos **HLA-DRB1*1501⁺** y **HLA-DRB1*1501⁻** y en los controles

		EM (n=371)	EM <i>DRB1*1501⁺</i> (n=135)	EM <i>DRB1*1501⁻</i> (n=236)	Controles (n=532)
Genotipos	Del/Del	282 (76%)	103 (76%)	179 (76%)	399 (75%)
	Ins/Del	82 (22%)	30 (22%)	52 (22%)	124 (23%)
	Ins/Ins	7 (1,9%)	2 (1,5%)	5 (2,1%)	9 (1,7%)
Alelos	Del	646 (87%)	236 (87%)	410 (87%)	922 (87%)
	Ins	96 (13%)	34 (13%)	62 (13%)	142 (13%)

Tabla 28. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo **rs2779248** del promotor del gen *NOS2A* en el conjunto de los enfermos de EM, en los enfermos *HLA-DRB1*1501⁺* y *HLA-DRB1*1501⁻* y en los controles.

		EM (n=400)	EM <i>DRB1*1501⁺</i> (n=150)	EM <i>DRB1*1501⁻</i> (n=250)	Controles (n=542)
Genotipos	AA	153 (38%)	62 (41%)	91 (36%)	222 (41%)
	AG	181 (45%)	63 (42%)	118 (47%)	243 (45%)
	GG	66 (17%)	25 (16%)	41 (16%)	77 (14%)
Alelos	A	487 (61%)	187 (62%)	300 (60%)	687 (63%)
	G	313 (39%)	113 (38%)	200 (40%)	397 (37%)

Tabla 29. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo **rs1137933** del promotor del gen *NOS2A* en el conjunto de los enfermos de EM, en los enfermos *HLA-DRB1*1501⁺* y *HLA-DRB1*1501⁻* y en los controles.

		EM (n=398)	EM <i>DRB1*1501⁺</i> (n=146)	EM <i>DRB1*1501⁻</i> (n=252)	Controles (n=550)
Genotipos	CC	248 (62%)	93 (64%)	155 (62%)	341 (62%)
	CT	128 (32%)	43 (30%)	85 (34%)	189 (34%)
	TT	22 (5,5%)	10 (6,8%)	12 (4,7%)	20 (3,6%)
Alelos	C	624 (78%)	229 (78%)	395 (78%)	871 (79%)
	T	172 (22%)	63 (22%)	109 (22%)	229 (21%)

Tabla 30. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo **rs2297518** del promotor del gen *NOS2A* en el conjunto de los enfermos de EM, en los enfermos *HLA-DRB1*1501⁺* y *HLA-DRB1*1501⁻* y en los controles.

		EM (n=391)	EM <i>DRB1*1501⁺</i> (n=143)	EM <i>DRB1*1501⁻</i> (n=248)	Controles (n=544)
Genotipos	CC	266 (68%)	95 (66%)	171 (69%)	355 (65%)
	CT	106 (27%)	38 (27%)	68 (27%)	168 (31%)
	TT	19 (4,9%)	10 (7,0%)	9 (3,6%)	21 (3,9%)
Alelos	C	638 (82%)	228 (80%)	410 (83%)	878 (81%)
	T	144 (18%)	58 (20%)	86 (17%)	210 (19%)

En un paso posterior se llevó a cabo el análisis de los haplotipos. Este se hizo por etapas añadiendo en cada paso alguno de los polimorfismos estudiados.

Análisis de Haplotipos

El estudio de los marcadores en conjunto nos hizo ver que existen dos bloques de LD. El primero de ellos formado por los polimorfismos del promotor, con la excepción del microsatélite pentanucleotídico que presenta una elevada variabilidad, y el segundo formado por los dos marcadores exónicos. Analizamos los dos bloques de LD por separado y conjuntamente. En primer lugar estudiamos los haplotipos del promotor sin y con el pentanucleótido (Tablas 31 y 32, respectivamente).

Tabla 31. Haplotipos formados por los polimorfismos del promotor de *NOS2A* sin incluir el microsatélite pentanucleotídico *NOS2*: rs2779251 / *NOS2A* (rs12720460) / rs2779248.

rs2779251	NOS2A rs12720460	rs2779248	EM (2n=732)	%	Controles (2n=1026)	%
C	Del	A	438	60	649	63
T	Del	G	135	19	142	14
C	Ins	G	91	12	130	13
C	Del	G	63	8,7	99	9,6
C	Ins	A	4	0,6	3	0,3
T	Ins	G	0	0,0	3	0,3

El haplotipo **T / Del / G** está significativamente aumentado en EM al compararlo con los controles [$p = 0,009$; OR = 1,41 (1,08-1,84)].

Tabla 32. Haplotipos formados por los polimorfismos del promotor de *NOS2A* incluyendo el microsatélite pentanucleotídico *NOS2*: rs2779251 / (CCTTT)_n / *NOS2A* (rs12720460) / rs2779248

rs2779251	NOS2 (CCTTT) _n	NOS2A rs12720460	rs2779248	EM (2n=720)	%	Controles (2n=898)	%
C	12	Del	A	141	20	184	21
C	11	Del	A	86	12	115	13
C	10	Del	A	67	9,3	112	12
C	13	Ins	G	48	6,6	46	5,1
T	11	Del	G	47	6,5	28	3,1
T	12	Del	G	38	5,3	30	3,4
C	13	Del	A	36	5,0	61	6,8
C	9	Del	A	35	4,8	29	3,3
C	11	Del	G	31	4,3	33	3,7
T	13	Del	G	25	3,5	27	3,0
C	14	Del	A	23	3,3	39	4,3
C	14	Ins	G	23	3,1	33	3,7
C	15	Del	A	17	2,4	8	0,9
C	10	Del	G	14	2,0	10	1,1
C	8	Del	A	13	1,8	9	1,0
C	12	Ins	G	12	1,7	24	2,7
C	12	Del	G	9	1,3	27	3,0
C	16	Del	A	9	1,2	8	0,9
C	15	Ins	G	7	1,0	7	0,7
T	8	Del	G	6	0,8	11	1,2
OTROS				33	4,5	56	6

El haplotipo (C / 10 / Del / A) muestra diferencias también con la EM ($p = 0,044$; OR = 0,72 (0,52-1,00)).

Posteriormente y tras analizar los haplotipos compuestos por los dos marcadores exónicos sin encontrar diferencias entre enfermos y controles, estimamos los haplotipos resultantes de la combinación de todos los marcadores, excluyendo al principio el microsatélite polimórfico (también estratificando por *HLA-DRB1*1501*, **Tabla 34**) y posteriormente incluyéndolo (**Tablas 33 y 35**, respectivamente).

Tabla 33. Haplotipos formados por los polimorfismos del gen *NOS2A* sin incluir el microsatélite pentanucleotídico *NOS2*: **rs2779251 / NOS2A (rs12720460) / rs2779248 / rs1137933 / rs2297518**.

rs2779251	NOS2A rs12720460	rs2779248	rs1137933	rs2297518	EM	%	CONTROLES	%
C	Del	A	C	G	406	56	584	57
C	Ins	G	C	G	86	12	122	12,0
T	Del	G	T	A	83	12	99	9,7
C	Del	G	C	G	29	4,0	47	4,6
C	Del	G	T	A	25	3,4	39	3,8
C	Del	A	C	A	10	1,4	28	2,7
T	Del	G	T	G	28	3,9	28	2,7
C	Del	A	T	A	15	2,1	18	1,7
C	Del	A	T	G	0	0,0	16	1,6
C	Del	G	T	G	8	1,2	12	1,1
T	Del	G	C	G	15	2,1	10	1,0
OTROS					15	2,0	19	1,9

Tabla 34. Haplotipos formados por los polimorfismos del gen *NOS2A* sin incluir el microsatélite pentanucleotídico *NOS2*: **rs2779251 / NOS2A (rs12720460) / rs2779248 / rs1137933 / rs2297518** en los enfermos de EM *DRB1*1501*⁺ y en los *DRB1*1501*⁻.

rs2779251	NOS2A rs12720460	rs2779248	rs1137933	rs2297518	EM <i>DRB1*1501</i> ⁺	%	EM <i>DRB1*1501</i> ⁻	%
C	Del	A	C	G	153	57	253	56
T	Del	G	T	A	31	12	52	12
C	Ins	G	C	G	30	11	56	12
C	Del	G	C	G	13	4,8	16	3,5
C	Del	G	T	A	11	3,9	14	3,1
C	Del	A	T	A	7	2,8	8	1,7
T	Del	G	T	G	7	2,7	21	4,6
C	Del	A	C	A	6	2,1	5	1,0
T	Del	G	C	G	3	1,1	12	2,7
C	Del	G	T	G	2	0,8	6	1,4
OTROS					6	2,1	7	1,6

No hay diferencias entre los enfermos de EM que son *HLA-DRB1*1501⁺* y *HLA-DRB1*1501⁻* en ningún haplotipo concreto, ni tampoco para la suma de los que son T / Del / G en los tres primeros marcadores, combinación hemos visto que se asocia a la EM en nuestra población.

Tabla 35. Haplotipos formados por los polimorfismos del gen *NOS2A* incluyendo el microsatélite pentanucleotídico *NOS2*: rs2779251 / (CCTTT)_n / *NOS2A* (rs12720460) / rs2779248/ rs1137933 / rs2297518.

rs2779251	NOS2 (CCTTT) _n	NOS2A rs12720460	rs2779248	rs1137933	rs2297518	EM	%	Controles	%
C	12	Del	A	C	G	136	19	170	19
C	11	Del	A	C	G	86	12	106	11
C	10	Del	A	C	G	61	8,4	96	11
C	13	Ins	G	C	G	46	6,4	43	4,8
C	13	Del	A	C	G	36	5,0	65	7,3
T	12	Del	G	T	A	31	4,3	20	2,2
C	14	Del	A	C	G	23	3,2	35	3,9
T	11	Del	G	T	A	23	3,2	19	2,2
C	14	Ins	G	C	G	22	3,0	31	3,5
C	9	Del	A	C	G	20	2,8	20	2,3
T	11	Del	G	T	G	20	2,7	0	0,0
T	13	Del	G	T	A	19	2,6	22	2,5
C	11	Del	G	C	G	18	2,5	21	2,3
C	15	Del	A	C	G	18	2,5	0	0,0
C	8	Del	A	C	G	13	1,8	0	0,0
C	12	Ins	G	C	G	13	1,8	23	2,6
C	9	Del	A	T	A	10	1,4	0	0,0
C	11	Del	G	T	A	10	1,4	11	1,3
C	10	Del	G	T	A	9	1,3	9	1,0
C	16	Del	A	C	G	9	1,2	0	0,0
C	12	Del	G	C	G	0	0,0	14	1,6
C	10	Del	A	C	A	0	0,0	11	1,2
T	8	Del	G	T	A	0	0,0	10	1,2
T	12	Del	G	T	G	0	0,0	10	1,1
OTROS						98	14	156	17

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. *MHC2TA*

Según los resultados obtenidos, parece que a diferencia de lo recogido en el trabajo de Swanberg y sus colaboradores [48], el polimorfismo que ellos identificaban como etiológico, -168A/G (rs3087456), en nuestra población actúa esencialmente como marcador genético sin una influencia directa en la enfermedad, ya que las frecuencias alélicas y genotípicas de ese SNP no resultan distintas entre nuestros enfermos y los controles. Previamente, este mismo marcador había sido estudiado en poblaciones japonesa, alemana, austriaca, e italiana encontrándose una frecuencia del alelo minoritario variable de 12%, 26%, 31% y 29%, respectivamente [129-132]. En población española esa proporción se asemeja a las obtenidas en las poblaciones caucásicas (25%). A pesar de que no encontramos asociación de este SNP, dos haplotipos formados por este marcador y el otro SNP analizado (rs4774) del exón 11, alteran la predisposición a padecer EM con nuestra muestra de enfermos. Ambos haplotipos parecen tener, por similitud con lo observado en AR [49], efectos independientes el uno del otro, lo que sugiere que podrían existir dos factores de susceptibilidad no identificados hasta el momento, que llevan al aumento o disminución de la susceptibilidad a padecer esta enfermedad. La expresión del RNA mensajero tras la estimulación con IFN- γ era menor en aquellos individuos homocigotos -168*GG [48] que en los que tenían los otros genotipos. Esta observación sugirió que el alelo de susceptibilidad estaba asociado con una menor inducción de la expresión de los genes de MHC de clase II por los estímulos inflamatorios. El mecanismo patogénico que los autores de este trabajo propusieron para justificar el aumento de susceptibilidad a

padecer Esclerosis Múltiple y Artritis Reumatoide, fue el de la existencia de una peor presentación antigénica a las células reguladoras que ejercen un papel protector.

En el sistema nervioso central de sujetos sanos las moléculas de MHC de clase I y clase II son indetectables o muy bajos [133, 134]. Sin embargo, en pacientes con EM la activación inmune que se produce lleva a la microglía y a los astrocitos a expresar estas moléculas [135, 136].

Nuestros datos apoyan la asociación del gen *MHC2TA* con la EM, pero no confirman el papel etiológico del polimorfismo situado en el promotor por sí mismo. Aunque el haplotipo que aumenta la susceptibilidad a la enfermedad lleva el alelo de riesgo -168*G, hay otro haplotipo que lo lleva sin que éste influya en la predisposición a la enfermedad.

Previamente, el polimorfismo del promotor -168A/G y otros polimorfismos situados en la región 3'UTR del mismo gen habían sido analizados independientemente en otras poblaciones sin que ninguno mostrase asociación con EM, pero sólo se estudiaron los haplotipos existentes para la región no traducida [137]. Estos resultados discrepaban con los obtenidos en experimentos con ratones. Los animales deficientes en CIITA parecían ser resistentes a la EAE [138, 139], incluso después de inyectarles células T CD4⁺ encefalitogénicas, lo que apoyaba la teoría de la importancia de la presentación antigénica en la periferia mediada por CIITA.

Las evidencias en contra del papel funcional del polimorfismo -168A/G en diversas enfermedades autoinmunes están incrementando, tal y como se ha visto recientemente [129, 132] y como los datos de otro estudio en Lupus [140] y los nuestros han corroborado con posterioridad. No obstante, validamos la asociación del gen *MHC2TA* con la Esclerosis Múltiple sin que llegásemos a observar una interacción con

los genes del HLA, ya que no encontramos diferencias significativas al estratificar nuestro grupo de enfermos según fuesen *HLA-DRB1*1501* positivos o negativos.

A pesar de no haber encontrado diferencias altamente significativas en el análisis de los haplotipos, hemos observado que dos de ellos presentan una cierta tendencia a la asociación ($p < 0,1$), uno orientado hacia la protección y el otro hacia la susceptibilidad. Esto concuerda con los resultados positivos que encontramos con nuestros enfermos de Artritis Reumatoide [49] para esos mismos haplotipos, lo que nos hace pensar que ambas enfermedades comparten una base genética, aunque el efecto de este gen en el caso de la EM puede ser menor que el existente en el caso de la AR y que por ello no seamos capaces de verlo tan claramente con nuestro grupo de enfermos.

2. *MHC2TA* y la infección por HHV-6A

Con este análisis hemos encontrado diferencias entre subgrupos de enfermos de EM clasificados en base a la presencia de niveles detectables de HHV-6A en el suero (indicador de la actividad viral) al examinar el *locus* del *MHC2TA*.

Ya se ha descrito que algunos herpesvirus son capaces de evadir, mediante varios mecanismos, la respuesta inmunológica del organismo que infecta, estando la mayoría de esos mecanismos relacionados con la inhibición de la presentación de antígenos, en la que el gen *MHC2TA* participa activamente. Como ejemplo, el citomegalovirus es capaz de disminuir la expresión de moléculas de MHC de clase II inducida por IFN- γ debido a una alteración de la fosforilación y la translocación al núcleo del factor de transcripción STAT1. Un análisis detallado indicó que este defecto reside en la activación del promotor de respuesta a IFN- γ del gen *MHC2TA* [51].

Dada la fuerte correlación existente entre ser portador del alelo *rs4774*C* y la presencia de replicación viral, y una mayor correlación incluso entre activación viral y padecer Esclerosis Múltiple, se podría especular acerca de que la presencia de este polimorfismo (u otro en estrecho desequilibrio de ligamiento con él) favoreciese que el virus permaneciera oculto a los “ojos” del sistema inmune. Esto llevaría a una activación viral que podría tener como consecuencia la aparición de algunos casos de Esclerosis Múltiple. La asociación de este alelo con “EM con activación viral” y no con “EM sin activación viral” cuando se compararon con los controles puede ser interpretada como si etiológicamente se tratara de dos enfermedades distintas, aunque clínicamente indistinguibles (fenocopias: condición ambiental, en este caso la infección viral, que imita o copia condición producida por los genes). Nuestros datos son prueba de que en ocasiones, los estudios genéticos se podrían realizar con pequeños grupos de

pacientes incluso en las enfermedades denominadas “complejas”. Más aún, se podría dar el caso de que en algunos estudios fuese preferible analizar grupos más pequeños pero mejor definidos (como en este caso el pequeño subgrupo con la enfermedad asociada al virus) en lugar de estudiar conjuntos mayores pero más heterogéneos. Aunque ambas aproximaciones pueden ser complementarias y el estudio de grandes muestras ha sido de inestimable valor para impulsar el conocimiento de la Esclerosis Múltiple como conjunto, el estudio de una interacción concreta como es ésta precisa grupos muy bien definidos para apreciar cualquier efecto que pudiese existir. El debate acerca de si, subyaciendo a la enfermedad existen muchos *loci* con un pequeño papel en grupos concretos de enfermos, o si por el contrario se trata del efecto unos pocos *loci* con unos efectos relativamente fuertes, sigue presente. También podría tratarse de la combinación de ambas posibilidades. Merece la pena mencionar que el porcentaje de riesgo atribuible poblacional para el alelo *rs4774*C*, esto es, el porcentaje de enfermos cuya enfermedad puede ser achacada a poseer ese alelo, es del 63%, lo cual indica un efecto bastante fuerte.

Aunque se podría discutir que el cambio aminoacídico que causa la variante *rs4774*C* (alanina a glicina) es la mutación etiológica que se esconde detrás del efecto observado, aquí no se pretende afirmar esto. El gen *MHC2TA* contiene más de 200 polimorfismos de un solo nucleótido y se escapa a los límites del presente estudio determinar cuál de ellos es el responsable. En los últimos años se han publicado algunos trabajos [64, 141] que afirman el hallazgo de supuestas variantes etiológicas tras un análisis multivariante, pero muchas de estas afirmaciones no han podido ser replicadas en otras poblaciones, sugiriendo que dichas variantes eran realmente marcadores genéticos de otras mutaciones, y que los resultados observados eran consecuencia del desequilibrio de ligamiento debido a la presencia de un grado limitado de diversidad

haplotípica. De unas poblaciones a otras esos desequilibrios pueden variar porque la frecuencia subyacente de los haplotipos también varíe de una población a otra. Por otra parte, esos estudios genéticos se diseñaron y llevaron a cabo bajo la presunción de que un SNP es la causa última de un efecto fenotípico observado, pero estudios más recientes sugieren que otros tipos de mutaciones en desequilibrio de ligamiento con SNPs (por ejemplo microdeleciones o variaciones en el número de copias) podrían estar implicados también en variaciones fenotípicas [142, 143].

El estudio aquí presentado puede sugerir que, ocultas bajo el nombre de Esclerosis Múltiple, existan varias entidades aún sin identificar con unos límites genéticos no bien definidos aún. Estos subtipos, una vez estuvieran bien definidos, podrían ser estudiados con grupos de casos y controles relativamente pequeños como los nuestros.

3. *EBF1* (*Early B-cell Factor*)

Estudios de barrido genómico propusieron hace poco años la región cromosómica 5q como zona ligada a la EM [144, 145]. Además, un artículo que comparó regiones cromosómicas, *loci* de caracteres cuantitativos (QTLs del inglés *Quantitative Trait Loci*), de enfermos de EM y del modelo murino, la EAE, tras analizar las similitudes de secuencia, definió genes de consenso que potencialmente conferirían susceptibilidad a la Esclerosis Múltiple [146]. Entre ellos se citaba el gen *EBF1*, en el cromosoma 5q34, aportando pruebas de localización del papel de este gen en la predisposición a la enfermedad.

En un estudio con tecnología de microarrays que medía simultáneamente la cantidad de transcrito de miles de genes se vio que para algunos de esos genes la concentración transcrito se correlacionaba con la de *EBF1*. En concreto, se detectó un aumento de unas 3,5 veces la cantidad de RNA mensajero de IL6, y de la proteína Tau asociada a microtúbulos (MAPT), listadas entre los 12 transcritos más abundantes encontrados [147].

Se ha visto que la concentración de IL6 está aumentada en el cerebro de los pacientes de EM y que su expresión en LCR también es mayor que en la población sana [148, 149], mientras que en ratones que no expresaban IL6 se veía resistencia a desarrollar la EAE [150]. La función de Tau es la de unirse y estabilizar los microtúbulos en las neuronas [151] y participar en el transporte axonal [152]. Las concentraciones de esta proteína se han encontrado más altas en el LCR de pacientes con EM en múltiples estudios [153], así como la presencia de depósitos de Tau fosforilada en los axones y cuerpos neuronales en las placas de desmielinización de ratones con EAE [154]. Esto hace pensar que una acumulación aberrante de estas

proteínas puede ser crucial en la alteración del transporte neuronal que lleve al desarrollo de una patología como ésta.

Nuestros resultados evidencian asociación del gen *EBF1* con EM. No hay estudios funcionales de los polimorfismos que hemos estudiado, a pesar de que este gen fue clonado hace ya más de 10 años. En cualquier caso, existen elementos reguladores de la transcripción de muchos genes que están localizados en regiones intrónicas [62, 155-157], y de hecho, el alelo de susceptibilidad de este polimorfismo intrónico del *EBF1* permitiría la unión del factor de transcripción AP-1, mientras que dicha unión está impedida por la presencia del alelo *rs1368297*T* (tal y como predice el software TFSEARCH ver 1.3). Los estudios funcionales que en un futuro se lleven a cabo ayudarán a clarificar cuál es el papel que juega este gen en la EM. No obstante, el SNP analizado en este trabajo podría estar actuando como marcador genético y podría ser él mismo la variante/s etiológica/s o encontrarse en LD con ésta/s.

En realidad, tan sólo la actividad que este gen desempeña como regulador de la maduración de los linfocitos B ya sería bastante para justificar su implicación funcional en esta patología. Cada vez hay más pruebas que apoyan la presencia de anticuerpos de tipo IgM sintetizados por linfocitos B CD5⁺ en LCR de pacientes con formas agresivas de EM [158]. Estos anticuerpos naturales reconocen antígenos de la mielina y son unos potentes activadores del complemento [159] y los dos unidos, anticuerpos y complemento, contribuyen a la desmielinización y al daño axonal.

4. *FcRL3* (*Fc Receptor Like-3*)

El polimorfismo -169T/C del promotor del gen *FcRL3* fue descrito originalmente como etiológico en Japón, ya que mostró correlación con la alteración de la expresión tanto *in vitro* como *in vivo* [57]. Los autores observaron que este polimorfismo confería un aumento de la susceptibilidad a padecer Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico y enfermedad Tiroidea Autoinmune, sugiriendo así un papel potencial en estas enfermedades autoinmunes. La asociación hallada con AR ha sido replicada en población asiática [160] y caucásica [161]. Sin embargo, otros grupos no han visto dicha asociación [162, 163] o tan sólo la han encontrado al considerar determinados subgrupos de pacientes [164, 165]. Estos resultados evidencian un complejo patrón de asociación con la enfermedad. El alelo -169*C, del que originalmente se dijo que aumentaba tanto los niveles de transcripción del gen como la susceptibilidad a la enfermedad, ha mostrado recientemente protección frente la enfermedad de Addison en población Británica [59], en concordancia con nuestros resultados en pacientes de EM españoles. Dicha heterogeneidad del alelo asociado entre las enfermedades autoinmunes sugiere que existen distintos mecanismos patogénicos subyacentes a cada una de ellas. Los resultados obtenidos pueden deberse a una influencia directa de los niveles de expresión de *FcRL3* aumentados en unas enfermedades y disminuidos en otras, que llevan hacia un efecto deletéreo final, o bien a una influencia indirecta del polimorfismo -169C/T, es decir, debido a LD. En este último caso, la variante etiológica putativa es más probablemente un marcador genético en desequilibrio de ligamiento con otros polimorfismos causantes (por ejemplo, distintos elementos reguladores funcionales en diferentes tipos celulares), y cada alelo marcaría un haplotipo que portaría el polimorfismo verdaderamente responsable para

cada enfermedad. Para la enfermedad de Addison y la EM la susceptibilidad estaría marcada por el alelo *-169*T*, mientras que para AR y LES el alelo *-169*C* es indicativo de mayor riesgo. El estudio de los haplotipos inferidos del gen *FcRL3* no aporta pistas acerca de donde reside la variante etiológica, hecho que es normal puesto que están en el mismo bloque. En este sentido, se analizaron los haplotipos extendidos a lo largo del gen *FcRL3* en la población Británica, y se encontró que un cambio no-sinónimo en el exón 3 (N28D) estaba en elevado desequilibrio de ligamiento con el alelo *-169*C*. Así, este cambio podría estar detrás del mecanismo patogénico aunque la asignación del polimorfismo etiológico está dificultada por el desequilibrio de ligamiento mencionado. No obstante, la base del efecto de dicho polimorfismo en las enfermedades autoinmunes podría residir en regiones que se extienden incluso más allá del gen *FcRL3*. Es interesante recordar que el gen *FcRL3* está localizado en un *cluster* de genes donde también mapean los FcγRs clásicos y sus homólogos, los FcRLs. En el modelo animal de la EM (EAE), los ratones deficientes en FcRγ (sin FcγRI, FcγRIII y FcεRI funcionales) presentaban una enfermedad significativamente atenuada. La expresión de FcRγ en células sistémicas accesorias (monocitos, células dendríticas...), pero no en las células que residen en el SNC, parece ser esencial para el desarrollo de la inflamación en este último, independientemente de la función presentadora de antígeno de las células o de la participación de anticuerpos [166].

Por otra parte, los ratones deficientes en FcγRIIB desarrollaban una enfermedad más severa que los ratones *wild-type* [167, 168]. Myhr y sus colaboradores [169] describieron la asociación de genotipos de FcγRIIa y de FcγRIIb con EM en pacientes noruegos. Sin embargo, en un estudio holandés de elevada potencia estadística no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los enfermos con EM y los controles en las frecuencias genotípicas obtenidas para FcγRIIa, FcγRIIa y FcγRIIb

[170]. Como estos autores estudiaron únicamente tres polimorfismos de manera independiente, los resultados negativos no permiten descartar la asociación de esos genes con la EM. Realmente, a menos que se haga un estudio minucioso, no podremos descartar el papel de un gen en una enfermedad.

En resumen, el debate acerca de si la región cromosómica donde el *cluster* de los genes *FcyR* reside está asociada con la susceptibilidad a padecer EM sigue abierto, y el polimorfismo -169C/T en el gen *FcRL3* parece ser un buen marcador de este efecto. Hay estudios en otras enfermedades en los que, a diferencia de nuestros resultados, el alelo -169*C está asociado con susceptibilidad. Es el caso de la enfermedad de Graves en población británica [171], que observa el mismo resultado que encontró el grupo de Kochi en Artritis Reumatoide y otras enfermedades autoinmunes como Lupus o Tiroiditis [57].

En la patogénesis de la EM existiría una alteración general de la regulación genética de la autoinmunidad, ya que no solamente se han encontrado asociados a la enfermedad polimorfismos en el gen *FcRL3* sino también otros en *CTLA4*, que tiene un papel clave en la regulación de las respuestas autoinmunes. Sin embargo, no se ha descrito asociación de la EM con otro gen muy importante en esa regulación que es *PTPN22*, mientras que sí se ha encontrado en el caso de la AR, otra muestra más de las diferencias entre ambas patologías.

5. Interleuquina 4 (*IL4*)

Como enfermedad poligénica y multifactorial, se han descrito numerosos genes asociados con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple. En ella se ve una expansión clonal de células Th1 y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , TNF- α e IL12, entre otras). Esas citoquinas participan en la activación de la respuesta inmunológica celular. La respuesta inmune humoral frente a patógenos extracelulares, caracterizada principalmente por la producción de anticuerpos por parte de las células B, es estimulada por citoquinas de tipo Th2 como la IL4 y la IL10. Nuestro grupo analizó anteriormente el papel del TNF y del gen de la IL10 en EM [35, 36, 172]. Con este trabajo intentamos evaluar el papel en esta enfermedad de la IL4, cuyo gen es otro candidato situado en un *cluster* de genes de citoquinas del cromosoma 5q23-31. Se han asociado polimorfismos de este gen con varias enfermedades autoinmunes como Artritis Reumatoide [73], enfermedad de Graves [173], enfermedad de Crohn [174] y Diabetes tipo 1 [175]. También con otras enfermedades inflamatorias como asma y atopia [60]. En el caso de la EM, hay estudios de asociación previos con resultados no concluyentes. Vandebroek y colaboradores [66] encontraron frecuencias genotípicas similares del polimorfismo VNTR situado en el intrón 3 del gen de la IL4 al comparar 256 enfermos de EM frente a 146 controles sanos en población Italiana. Sin embargo, separaron el grupo de los enfermos en 164 Caucásicos y 92 Sardos, y de hecho, en este último grupo encontraron una menor frecuencia de heterocigotos (24% en controles frente al 15% en los enfermos de EM Sardos). Esta diferencia no llegó a ser significativa pero hay que tener en cuenta que hay poca potencia estadística. Los autores apuntaron que la frecuencia de portadores del alelo minoritario se correlacionaba con la edad de debut de los pacientes en la enfermedad, pero nosotros no fuimos capaces de replicar estos

resultados, ya que no observamos diferencias entre la edad de debut de los enfermos y ninguno de los genotipos en población española.

Otro estudio de asociación del gen *IL4* con resultados negativos se llevó a cabo en población sueca que analizó 147 enfermos de EM y 95 controles [69]. Se podría especular acerca de las causas de las discrepancias con nuestros resultados. La falta de potencia estadística es una objeción muy plausible, ya que este mismo grupo no encontró asociación de otra citoquina de probado efecto en la EM como es la *IL-10* [172, 176], aunque la etnia y las diferencias clínicas entre las dos poblaciones podrían ser también importantes factores en juego.

Un estudio de ligamiento de 15 genes de citoquinas o sus receptores llevado a cabo con 116 parejas de hermanos con EM en población francesa tan sólo vio implicación del gen *IL2-R β* [67].

El único estudio que arrojó resultados de asociación positivos del gen de la *IL4* con la EM fue el realizado en población norteamericana [68]. En él se decía que existía asociación del VNTR del intrón 3 con la EM debido a la escasez de heterocigotos dentro del grupo de los enfermos, lo que coincide plenamente con nuestros resultados. Así pues, parecía necesario replicar esos resultados en una población independiente para confirmar el papel de esta citoquina en la Esclerosis Múltiple.

En el trabajo de Kantarci y col. [68] se describió que cuatro polimorfismos del gen de la *IL4* estaban en desequilibrio de ligamiento. Nosotros encontramos desequilibrio entre los dos que hemos estudiado en la población española. Cuando comparamos las frecuencias halladas en nuestra población con las descritas por Kantarci encontramos una gran similitud. De cualquier manera no conseguimos reproducir la tendencia a la asociación que ellos observaron al estratificar el grupo de los enfermos atendiendo a la forma clínica que presentaban, en concreto con el grupo de los que

presentaban la forma Primaria-Progresiva o EM-PP. Este mismo año y posterior a nuestro trabajo ha aparecido un nuevo estudio en población Iraní en el que tampoco se encuentra asociación de los polimorfismos de *IL4* [177].

Se ha descrito que el polimorfismo del exón 1 estudiado está en completo desequilibrio de ligamiento con otra variante situada en el promotor del gen *IL4* en posición -590, y del que se ha dicho que tiene un papel funcional que afecta a los niveles de la citoquina [174]. El aumento en la producción de IL4 que se produciría, sugiere un papel protector que concuerda con la terapia basada en el empleo de citoquinas para la enfermedad, puesto que se ha postulado que tanto IL4 como IFN- β , el tratamiento estándar en EM, inhiben alguna de las actividades del IFN- γ . No obstante, la pérdida del efecto protector de este alelo cuando aparece en homocigosis en varias poblaciones [66, 68, 178] iría en contra de un papel directo del gen *IL4* en la protección frente a la aparición de la EM. Una posible explicación para el hecho de que los polimorfismos analizados en el gen *IL4* se hayan visto asociados con la enfermedad cuando aparecen en heterocigosis sería que realmente los alelos actúan como marcadores genéticos, cada uno de los cuales se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento con sendas variantes etiológicas, a su vez marcadas por uno de los alelos del polimorfismo. La presencia de ambas sería necesaria para la aparición de la enfermedad. Teniendo en cuenta que el gen *IL4* está dentro de un *cluster* de genes implicados en la respuesta inmune, y dada la existencia de bloques de haplotipos descritos en 5q31 [65, 179], puede que resulte muy difícil determinar qué haplotipo o qué gen en particular es el responsable de la asociación observada. En este sentido podemos hablar de los genes *SLC22A4* y *SLC22A5*, que codifican los transportadores catiónicos OCTN1 y OCTN2, y que se han asociado a varias enfermedades autoinmunes como Diabetes tipo 1, AR, Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa [61, 63, 64, 180]. Este *locus* 5q31 parece

análogo a la región del HLA, con la que numerosas enfermedades inflamatorias y autoinmunes se han visto asociadas, aunque no se hayan podido hasta el momento identificar todas las mutaciones causales. Nuestros resultados, junto a los de otros grupos, sugieren que ciertos haplotipos de este *cluster* de genes de citoquinas pueden también conferir riesgo a padecer EM, tal y como ha sucedido en el caso de otras enfermedades.

6. Interferón-gamma (*IFNG*)

En este análisis describimos la asociación entre el microsatélite situado en el primer intrón del gen *IFNG* y la aparición de brotes dentro de los dos primeros años de tratamiento con IFN- β para los pacientes con EM-RR.

Una dificultad en la interpretación de los resultados es comprobar si la asociación con los brotes es dependiente del tratamiento. Se podría argumentar que la asociación entre los alelos del microsatélite y la frecuencia de los brotes aquí descrita se daría también en pacientes no tratados. No obstante, no hemos hallado asociación entre la tasa de brotes antes del tratamiento y la aparición de brotes después del mismo (datos poblacionales recogidos en **Tabla 18**, pág. 100), y de hecho, no encontramos evidencias de asociación entre el polimorfismo y la tasa de brotes antes del tratamiento. Además, un estudio reciente no halló ninguna asociación entre las características clínicas y de MRI de los enfermos de EM incluidos en él y el mismo polimorfismo que nosotros estudiamos aquí [78].

Otra cuestión interesante sería la relevancia del polimorfismo estudiado en el contexto de la patogénesis y el tratamiento de la EM. El microsatélite polimórfico situado en el primer intrón del gen *IFNG* está asociado con los niveles de producción de esta citoquina pro-inflamatoria [181], y por eso se ha estudiado en numerosas condiciones inflamatorias. A pesar de esto, la variación responsable de los cambios en los niveles de la citoquina probablemente no se deba al microsatélite por sí mismo, sino a otra mutación, como puede ser un SNP, situado en las proximidades. Se ha descrito la existencia de un SNP (+874T/A) que está en desequilibrio de ligamiento total con el microsatélite y se ha postulado que en este caso el microsatélite actuaría como un marcador del él [182].

El alelo 12 del microsatélite IFNG se ha relacionado con un aumento en los niveles de producción de IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica tras ser estimuladas con fitohemaglutinina [181]. Los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* llevados a cabo con células de individuos sanos son difíciles de extrapolar a los pacientes de EM, en los que seguramente existe un ambiente de citoquinas mucho más complejo. Había razones *a priori* para sospechar y esperar que se produjera una mejoría de la respuesta tanto en los enfermos con una baja producción de IFN- γ (porque ellos serían inhibidos más fácilmente) como en los pacientes con una producción exacerbada de IFN- γ (porque ellos serían los que pueden beneficiarse de una terapia con anti-IFN- γ). A favor de un efecto directo de los polimorfismos de la vía del interferón en la respuesta al tratamiento (al contrario de otro más convoluto que implicara anticuerpos frente a IFN- β), está la asociación descrita en la población española entre polimorfismos situados en los genes del receptor y la respuesta a IFN- β después de dos años de tratamiento [183], aunque hay que advertir que estos resultados no han sido confirmados por otros grupos [79].

Ahora estamos comenzando a recoger datos de nuestros pacientes tras 4 años de tratamiento con la finalidad de evaluar la importancia de nuestros resultados en las respuestas a largo plazo al tratamiento con IFN- β .

7. Osteopontina (OPN)

La ausencia de resultados que indiquen una asociación del gen *OPN* con la EM podría resultar paradójica considerando el papel tan relevante que juega la proteína en los procesos inflamatorios, tal y como se ha demostrado en estudios funcionales. En cualquier caso, la falta de asociación puede ser explicada dado que hasta ahora no se han descrito diferencias funcionales asociadas a los alelos o al menos que sean relevantes para la patogénesis de la EM. Los genes tienen múltiples polimorfismos a lo largo de su secuencia, pero a la hora de encontrar una asociación con alguna enfermedad, puede que sean etiológicos o que estén en desequilibrio de ligamiento con la variante responsable. Así pues, no se encontrará ninguna asociación si los polimorfismos no producen ninguna alteración en la proteína (procesamiento, estructura, afinidad, etc...), en la expresión del gen (transcripción, procesado y transporte del RNA mensajero) o si no son casi-equivalentes a las variantes realmente responsables de esa asociación.

Un estudio en población italiana [184] apuntó la existencia de una asociación y de diferencias funcionales entre los individuos homocigotos para el único haplotipo que contiene la variante 795*C según nuestra nomenclatura, y que ellos llamaron 750, y el resto de los individuos. Sin embargo, nosotros no hemos encontrado ninguna diferencia en la susceptibilidad para los homocigotos C en la posición 795 y esto puede ser debido a que esta mutación no confiera susceptibilidad *per se* en la población italiana, sino que actúe como marcador genético de una variante desconocida quizá tan sólo presente en esta población y no en la española, aunque ambas sean Mediterráneas, y que verdaderamente sea esta variante por descubrir la responsable. Los datos que obtuvimos en nuestra población control y en otra de enfermos de Artritis Reumatoide para los

cuatro polimorfismos exónicos de la *OPN* indicaron que estos SNPs conformaban sólo dos haplotipos mayoritarios. Nuestros datos se ven reforzados por los resultados negativos que otros han encontrado [185] aunque no se puede descartar que exista algún polimorfismo etiológico en el gen. Un estudio japonés tampoco encontró asociación del marcador en la posición 795, pero sorprendentemente sí la obtuvo en el caso de otro de los marcadores que anteriormente habíamos estudiado, el situado en posición 327 [186]. Dado el elevadísimo desequilibrio de ligamiento existente entre los dos SNPs, la asociación de uno sólo de ellos es bastante improbable. Esto sugeriría que la estructura haplotípica podría ser muy diferente de una población a otra y eso podría explicar los resultados discordantes observados.

8. Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (*MIF*)

Hemos estudiado dos polimorfismos localizados en el promotor del gen *MIF* que previamente se habían visto asociado a varias enfermedades de componente inflamatorio [102-104, 187-190]. Nosotros no hallamos ningún resultado positivo al considerar la población de enfermos de EM de manera global y compararla frente a los controles para ninguno de los marcadores analizados (*CATT*₅₋₈ en la posición -794 y el cambio G/C en la posición -173). En un estudio anterior, encontramos asociación de los portadores del alelo -173*C, de los portadores del alelo (*CATT*)₇ y del haplotipo que contenía ambos alelos con la enfermedad Celiaca en población española [189].

En Esclerosis Múltiple ese efecto que confiere susceptibilidad no se observa claramente en ninguno de los alelos con los que se ha encontrado asociación para otras enfermedades. Únicamente al estratificar el grupo de los pacientes de EM atendiendo al subtipo de *HLA-DR2* se encuentra una cierta tendencia a la asociación. Así, en el conjunto de los enfermos que presentaban el alelo *DRB1*1501*, los portadores del alelo -173*C y los del alelo (*CATT*)₇ fueron los que mayores diferencias mostraron al ser comparados con los controles sanos.

Creemos que, a pesar de no llegar a ver diferencias significativas, existe una relación entre estos polimorfismos y la EM. Esa relación iría en el mismo sentido que la observada en enfermedad Celiaca y en otras enfermedades de naturaleza inflamatoria con las que se han asociado estos polimorfismos. Es posible que el papel que desempeñe en la EM sea de menor relevancia y por tanto el riesgo relativo disminuya. Esto se traduce en que, para encontrar asociación de un factor de este tipo sería preciso disponer de grupos de pacientes y controles más numerosos, mientras que para detectar el efecto de un factor cuyo papel en la enfermedad es más notable no sería necesario

disponer de tantos individuos para tener la potencia estadística suficiente. Paradójicamente, al dividir una muestra grande como es el grupo global de los enfermos de EM en dos grupos menores que serían en nuestro caso enfermos *DRB1*1501* positivos y negativos, el estudio global podría ganar en potencia estadística si se considerase como resultado positivo el correspondiente a uno sólo de esos subgrupos y la potencia original del estudio con el conjunto de los enfermos fuera baja. Este hecho podría explicar el débil efecto que se encuentra en el subgrupo de enfermos con EM que son *DRB1*1501*, aunque pensamos que otros grupos deberían tratar de replicar esta observación para poder verificar nuestra teoría.

El hecho de que este gen se haya visto asociado con otras patologías autoinmunes nos hace pensar que también debe estar jugando un papel en la EM. No es el primer caso en el que un factor asociado a una enfermedad también se asocia con otra que comparte mecanismos moleculares con ella. Un ejemplo es el de los trabajos realizados con el Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) en el modelo murino de colitis ulcerosa y en el de EM. Esta proteína muestra resultados similares en sendos estudios y por tanto parece que las dos enfermedades comparten factores de riesgo y están relacionadas [191, 192]. Por esto creemos que, aunque muy débil, existe una asociación del gen *MIF* en la EM, al igual que se ha visto en otras enfermedades inflamatorias.

9. Oxido Nítrico Sintasa Inducible (*NOS2A*)

Estudiamos un total de seis marcadores repartidos en el gen *NOS2A* que previamente habían sido descritos. Cuatro de ellos están situados en la región promotora y los otros dos en zona codificante (exones).

En la Enfermedad Celiaca el alelo (*CCTTT*)₁₀ se encontró asociado a protección ($p = 0,04$; $OR = 0,75$) en población española. En nuestra población de enfermos de EM se puede observar una muy leve tendencia a proteger sin que la diferencia con el grupo de controles llegue a ser significativa ($p = 0,11$; $OR = 0,8$). Este hecho se podría explicar desde el punto de vista de que en la EC y en la EM existen mecanismos moleculares comunes que participan en la respuesta inmunológica de ambas patologías, en concreto en la fase efectora. Sin embargo, los genes que intervienen en dichos mecanismos pueden tener distintos grados de participación. Bajo este supuesto se podría decir que este alelo está actuando como marcador de “algo” que confiere protección frente a ambas enfermedades, pero en el caso de la EM en menor medida. Eso hace que sea difícil llegar a ver la asociación del mismo con el tamaño muestral que tenemos.

No obstante, al analizar los haplotipos existentes en nuestra población y que resultan de la combinación de tres de los cuatro marcadores del promotor (rs2779251 / *NOS2A* (rs12720460) / rs2779248 ya que excluimos el microsatélite pentanucleotídico), podemos ver que uno de esos haplotipos, **T / Del / G**, se asocia claramente con la susceptibilidad a padecer EM ($p = 0,009$; $OR = 1,41$ (1,08-1,84)), tal y como también se ha descrito en los enfermos celiacos de población española (Núñez, C *et al.*, datos sin publicar).

El motivo de la exclusión en un principio del microsatélite *NOS2* es que se trata de un polimorfismo con numerosos alelos que origina un número muy elevado de

haplotipos (**Tabla 35**, pág. 115). El hecho de que aparezcan tantas combinaciones posibles hace pensar que ese microsatélite ha mutado a una elevada tasa a lo largo de la evolución, independientemente del haplotipo que lo contuviera. Esta alta mutabilidad nos hizo pensar que no sería un buen marcador, dado que el LD existente entre él y los demás marcadores se ha erosionado en gran medida como ya habían propuesto en su trabajo Burgner y colaboradores [193]. Sin embargo, al analizar los bloques de desequilibrio por separado, observamos que uno de los haplotipos que incluía el alelo *(CCTTT)₁₀*, el mismo que mostraba tendencia por sí mismo a la protección frente a la EM y que estaba asociado en la EC, mostraba diferencias significativas al comparar el conjunto de los enfermos de EM con los controles. El citado haplotipo, compuesto por los cuatro polimorfismos situados en la región promotora (*rs2779251 / (CCTTT)_n / NOS2A (rs12720460) / rs2779248*) es el que lleva los alelos **C / (CCTTT)₁₀ / Del / A** ($p = 0,044$; $OR = 0,72$).

Podemos pensar que la causa de que el alelo del microsatélite por sí solo no se asocie y sin embargo el haplotipo que lo incluye sí lo haga, se debe a que ese haplotipo concreto está en desequilibrio de ligamiento con el factor verdaderamente responsable de la asociación. Al analizar sólo el pentanucleótido estamos agrupando todos los haplotipos que contienen ese alelo y el efecto protector observado queda diluido y pasa inadvertido.

Para el haplotipo que se asocia con la susceptibilidad a padecer EM (**T / Del / G**) no observamos un mayor efecto del mismo en la enfermedad después de desglosarlo según los diferentes alelos del microsatélite polimórfico. No encontramos ningún haplotipo específico asociado y vemos que el efecto es resultado de la agrupación de todos ellos. Es posible que este haplotipo esté marcando una mutación etiológica desconocida que está presente en todos los haplotipos que contienen esa combinación

de alelos del promotor. En ese caso, la aparición de dicha mutación etiológica sería anterior a la diversificación por mutación del microsatélite.

A la vista de estos resultados, es posible que en el gen *NOS2A* existan diferentes factores funcionales que afectan a la susceptibilidad a padecer EM.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El efecto del gen *MHC2TA* en la susceptibilidad a padecer EM se dirige en un sentido paralelo al observado en Artritis Reumatoide, lo que sugiere que en ambas patologías existen ciertos mecanismos etiológicos comunes, aunque el/los polimorfismos responsables no se conocen.
2. El alelo C del polimorfismo rs4774, situado en el exón 11 del gen *MHC2TA*, está asociado con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple en aquellos enfermos que presentan replicación activa del Herpesvirus 6A.
3. Las asociaciones encontradas de los marcadores estudiados en el gen *EBF1* apuntan a que el factor de transcripción codificado por él participa en los mecanismos por los que aparece la enfermedad.
4. La asociación encontrada del alelo -169*T del gen *FcRL3* con la susceptibilidad a padecer EM, al igual que en la enfermedad de Addison y al contrario que en la AR y otras enfermedades autoinmunes, sugiere que existen mecanismos genéticos distintos implicados en la aparición de unas y otras.
5. La asociación en heterocigosis de los marcadores estudiados en el gen *IL4*, que están casi en completo LD, sugiere que existen, situados en la región 5q31, al menos dos factores genéticos etiológicos marcados por sendos alelos de los polimorfismos de *IL4*.

6. Los alelos 13 y 14 del microsatélite IFNG situado en el gen *IFNG* se asocian con la aparición de brotes en los pacientes de EM tratados durante dos años con IFN- β .
7. Los cuatro polimorfismos estudiados en el gen *OPN* no muestran indicios de asociación con la enfermedad, de distorsión en la transmisión de padres a hijos, ni tampoco de una interacción con el HLA.
8. Nuestro estudio refleja una magnitud de efecto (OR = 1,23) semejante a la obtenida en enfermedad Celiaca y en Artritis Reumatoide para los alelos -173*C y (CATT)₇ del gen *MIF*. Sin embargo, la falta de potencia estadística hace necesario ampliar el estudio.
9. Ninguno de los marcadores del gen *NOS2A* por separado se asocia con la enfermedad; sin embargo, el haplotipo compuesto por los alelos rs2779251*T / rs12720460*Del / rs2779248*G confiere susceptibilidad a la EM, mientras que el haplotipo rs2779251*C / (CCTTT)₁₀ / rs12720460*Del / rs2779248*A, marca un factor de protección frente a la esclerosis múltiple.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kurtzke, JF, Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.*, 1983. **33**(11): p. 1444-52.
- 2 Rosati, G, The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci.*, 2001. **22**(2): p. 117-39.
- 3 McDonald, WI, Relapse, remission, and progression in multiple sclerosis. *N Engl J Med.*, 2000. **343**(20): p. 1486-7.
- 4 Gijbels, K, Engelborghs, S., De Deyn, PP., Experimental autoimmune encephalomyelitis: an animal model for multiple sclerosis. *Neurosci Res Commun*, 2000. **26**: p. 193–206.
- 5 Swanborg, RH, Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev.*, 2001. **184**: p. 129-35.
- 6 Poser, CM, Paty, DW, Scheinberg, L, McDonald, WI, Davis, FA, Ebers, GC, Johnson, KP, Sibley, WA, Silberberg, DH and Tourtellotte, WW, New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*, 1983. **13**(3): p. 227-31.
- 7 McDonald, WI, Compston, A, Edan, G, Goodkin, D, Hartung, HP, Lublin, FD, McFarland, HF, Paty, DW, Polman, CH, Reingold, SC, Sandberg-Wollheim, M, Sibley, W, Thompson, A, van den Noort, S, Weinshenker, BY and Wolinsky, JS, Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.*, 2001. **50**(1): p. 121-7.
- 8 Polman, CH, Reingold, SC, Edan, G, Filippi, M, Hartung, HP, Kappos, L, Lublin, FD, Metz, LM, McFarland, HF, O'Connor, PW, Sandberg-Wollheim, M,

- Thompson, AJ, Weinshenker, BG and Wolinsky, JS, Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.*, 2005. **58**(6): p. 840-6.
- 9 Poser, CM, Revisions to the 2001 McDonald diagnostic criteria. *Ann Neurol.*, 2006. **59**(4): p. 727-8.
- 10 Fox, RJ and Ransohoff, RM, New directions in MS therapeutics: vehicles of hope. *Trends Immunol.*, 2004. **25**(12): p. 632-6.
- 11 Ann Marrie, R and Rudick, RA, Drug Insight: interferon treatment in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006. **2**(1): p. 34-44.
- 12 Miller, DH, Khan, OA, Sheremata, WA, Blumhardt, LD, Rice, GP, Libonati, MA, Willmer-Hulme, AJ, Dalton, CM, Miszkiet, KA and O'Connor, PW, A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.*, 2003. **348**(1): p. 15-23.
- 13 Marrie, RA, Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol.*, 2004. **3**(12): p. 709-18.
- 14 Stratton, CW and Wheldon, DB, Multiple sclerosis: an infectious syndrome involving *Chlamydia pneumoniae*. *Trends Microbiol*, 2006. **14**(11): p. 474-9.
- 15 Swanborg, RH, Whittum-Hudson, JA and Hudson, AP, Infectious agents and multiple sclerosis--are *Chlamydia pneumoniae* and human herpes virus 6 involved? *J Neuroimmunol*, 2003. **136**(1-2): p. 1-8.
- 16 Lunemann, JD and Munz, C, Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2007. **7**(3): p. 253-8.

- 17 Sandberg-Wollheim, M, Vandvik, B, Nadj, C and Norrby, E, The intrathecal immune response in the early stage of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 1987. **81**(1): p. 45-53.
- 18 Gutierrez, J, Vergara, MJ, Guerrero, M, Fernandez, O, Piedrola, G, Morales, P and Maroto, MC, Multiple sclerosis and human herpesvirus 6. *Infection*, 2002. **30**(3): p. 145-9.
- 19 Cermelli, C, Berti, R, Soldan, SS, Mayne, M, D'Ambrosia J, M, Ludwin, SK and Jacobson, S, High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis*, 2003. **187**(9): p. 1377-87.
- 20 Wucherpfennig, KW and Strominger, JL, Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*, 1995. **80**(5): p. 695-705.
- 21 Neumann, J, Eis-Hubinger, AM and Koch, N, Herpes simplex virus type 1 targets the MHC class II processing pathway for immune evasion. *J Immunol*, 2003. **171**(6): p. 3075-83.
- 22 Lee, AW, Hertel, L, Louie, RK, Burster, T, Lacaille, V, Pashine, A, Abate, DA, Mocarski, ES and Mellins, ED, Human cytomegalovirus alters localization of MHC class II and dendrite morphology in mature Langerhans cells. *J Immunol*, 2006. **177**(6): p. 3960-71.
- 23 Johnson, DC and Hegde, NR, Inhibition of the MHC class II antigen presentation pathway by human cytomegalovirus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002. **269**: p. 101-15.
- 24 Sadovnick, AD, Armstrong, H, Rice, GP, Bulman, D, Hashimoto, L, Paty, DW, Hashimoto, SA, Warren, S, Hader, W, Murray, TJ and et al., A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol*, 1993. **33**(3): p. 281-5.

- 25 Sadovnick, AD, Baird, PA and Ward, RH, Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet*, 1988. **29**(3): p. 533-41.
- 26 Haines, JL, Ter-Minassian, M, Bazyk, A, Gusella, JF, Kim, DJ, Terwedow, H, Pericak-Vance, MA, Rimmler, JB, Haynes, CS, Roses, AD, Lee, A, Shaner, B, Menold, M, Seboun, E, Fitoussi, RP, Gartioux, C, Reyes, C, Ribierre, F, Gyapay, G, Weissenbach, J, Hauser, SL, Goodkin, DE, Lincoln, R, Usuku, K, Oksenberg, JR and et al., A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nat Genet.*, 1996. **13**(4): p. 469-71.
- 27 Sadovnick, AD, Dyment, D and Ebers, GC, Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Epidemiol Rev*, 1997. **19**(1): p. 99-106.
- 28 Dyment, DA, Ebers, GC and Sadovnick, AD, Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 2004. **3**(2): p. 104-10.
- 29 Kenealy, SJ, Pericak-Vance, MA and Haines, JL, The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2003. **143**(1-2): p. 7-12.
- 30 Olerup, O and Hillert, J, HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens.*, 1991. **38**(1): p. 1-15.
- 31 Clerici, N, Hernandez, M, Fernandez, M, Rosique, J and Alvarez-Cermeno, J, Multiple sclerosis is associated with HLA-DR2 antigen in Spain. *Tissue Antigens*, 1989. **34**(5): p. 309-11.
- 32 Oksenberg, JR, Barcellos, LF, Cree, BA, Baranzini, SE, Bugawan, TL, Khan, O, Lincoln, RR, Swerdlin, A, Mignot, E, Lin, L, Goodin, D, Erlich, HA, Schmidt, S, Thomson, G, Reich, DE, Pericak-Vance, MA, Haines, JL and Hauser, SL, Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet.*, 2004. **74**(1): p. 160-7. Epub 2003 Dec 10.

- 33 Compston, DA, Batchelor, JR and McDonald, WI, B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. *Lancet.*, 1976. **2**(7998): p. 1261-5.
- 34 Allcock, RJ, de la Concha, EG, Fernandez-Arquero, M, Vigil, P, Conejero, L, Arroyo, R and Price, P, Susceptibility to multiple sclerosis mediated by HLA-DRB1 is influenced by a second gene telomeric of the TNF cluster. *Hum Immunol.*, 1999. **60**(12): p. 1266-73.
- 35 Fernandez-Arquero, M, Arroyo, R, Rubio, A, Martin, C, Vigil, P, Conejero, L, Figueredo, MA and de la Concha, EG, Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis. *Neurology.*, 1999. **53**(6): p. 1361-3.
- 36 Martinez, A, Rubio, A, Urcelay, E, Fernandez-Arquero, M, De Las Heras, V, Arroyo, R, Villoslada, P, Montalban, X and De La Concha, EG, TNF-376A marks susceptibility to MS in the Spanish population: A replication study. *Neurology.*, 2004. **62**(5): p. 809-10.
- 37 Fogdell, A, Olerup, O, Fredrikson, S, Vrethem, M and Hillert, J, Linkage analysis of HLA class II genes in Swedish multiplex families with multiple sclerosis. *Neurology.*, 1997. **48**(3): p. 758-62.
- 38 Yeo, TW, De Jager, PL, Gregory, SG, Barcellos, LF, Walton, A, Goris, A, Fenoglio, C, Ban, M, Taylor, CJ, Goodman, RS, Walsh, E, Wolfish, CS, Horton, R, Traherne, J, Beck, S, Trowsdale, J, Caillier, SJ, Ivinson, AJ, Green, T, Pobywajlo, S, Lander, ES, Pericak-Vance, MA, Haines, JL, Daly, MJ, Oksenberg, JR, Hauser, SL, Compston, A, Hafler, DA, Rioux, JD and Sawcer, S, A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol.*, 2007. **61**(3): p. 228-36.

- 39 Haines, JL, Bradford, Y, Garcia, ME, Reed, AD, Neumeister, E, Pericak-Vance, MA, Rimmler, JB, Menold, MM, Martin, ER, Oksenberg, JR, Barcellos, LF, Lincoln, R and Hauser, SL, Multiple susceptibility loci for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.*, 2002. **11**(19): p. 2251-6.
- 40 Consortium., TIMSG, Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *N Engl J Med*, 2007. **29**: p. 29.
- 41 Patarroyo, JC, Stuve, O, Piskurich, JF, Hauser, SL, Oksenberg, JR and Zamvil, SS, Single nucleotide polymorphisms in MHC2TA, the gene encoding the MHC class II transactivator (CIITA). *Genes Immun.*, 2002. **3**(1): p. 34-7.
- 42 Reith, W, LeibundGut-Landmann, S and Waldburger, JM, Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol.*, 2005. **5**(10): p. 793-806.
- 43 van den Elsen, PJ, Holling, TM, Kuipers, HF and van der Stoep, N, Transcriptional regulation of antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(1): p. 67-75.
- 44 LeibundGut-Landmann, S, Waldburger, JM, Krawczyk, M, Otten, LA, Suter, T, Fontana, A, Acha-Orbea, H and Reith, W, Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(6): p. 1513-25.
- 45 Menge, T, Hartung, HP and Stuve, O, Statins--a cure-all for the brain? *Nat Rev Neurosci.*, 2005. **6**(4): p. 325-31.
- 46 Kuipers, HF and van den Elsen, PJ, Statins and control of MHC2TA gene transcription. *Nat Med.*, 2005. **11**(4): p. 365-6; author reply 6-7.
- 47 Kwak, B, Mulhaupt, F, Myit, S and Mach, F, Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med.*, 2000. **6**(12): p. 1399-402.

- 48 Swanberg, M, Lidman, O, Padyukov, L, Eriksson, P, Akesson, E, Jagodic, M, Lobell, A, Khademi, M, Borjesson, O, Lindgren, CM, Lundman, P, Brookes, AJ, Kere, J, Luthman, H, Alfredsson, L, Hillert, J, Klareskog, L, Hamsten, A, Piehl, F and Olsson, T, MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet*, 2005. **37**(5): p. 486-94.
- 49 Martinez, A, Sanchez-Lopez, M, Varade, J, Mas, A, Martin, MC, de Las Heras, V, Arroyo, R, Mendoza, JL, Diaz-Rubio, M, Fernandez-Gutierrez, B, de la Concha, EG and Urcelay, E, Role of the MHC2TA gene in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis.*, 2007. **66**(3): p. 325-9. Epub 2006 Sep 29.
- 50 Lilley, BN and Ploegh, HL, Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. *Immunol Rev.*, 2005. **207**: p. 126-44.
- 51 Le Roy, E, Muhlethaler-Mottet, A, Davrinche, C, Mach, B and Davignon, JL, Escape of human cytomegalovirus from HLA-DR-restricted CD4(+) T-cell response is mediated by repression of gamma interferon-induced class II transactivator expression. *J Virol*, 1999. **73**(8): p. 6582-9.
- 52 Maier, H, Ostraat, R, Gao, H, Fields, S, Shinton, SA, Medina, KL, Ikawa, T, Murre, C, Singh, H, Hardy, RR and Hagman, J, Early B cell factor cooperates with Runx1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription. *Nat Immunol.*, 2004. **5**(10): p. 1069-77. Epub 2004 Sep 12.
- 53 Garel, S, Marin, F, Grosschedl, R and Charnay, P, Ebf1 controls early cell differentiation in the embryonic striatum. *Development.*, 1999. **126**(23): p. 5285-94.

- 54 Lin, H and Grosschedl, R, Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature*, 1995. **376**(6537): p. 263-7.
- 55 Ziemssen, T and Ziemssen, F, The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Autoimmun Rev*, 2005. **4**(7): p. 460-7.
- 56 Davis, RS, Ehrhardt, GR, Leu, CM, Hirano, M and Cooper, MD, An extended family of Fc receptor relatives. *Eur J Immunol.*, 2005. **35**(3): p. 674-80.
- 57 Kochi, Y, Yamada, R, Suzuki, A, Harley, JB, Shirasawa, S, Sawada, T, Bae, SC, Tokuhiro, S, Chang, X, Sekine, A, Takahashi, A, Tsunoda, T, Ohnishi, Y, Kaufman, KM, Kang, CP, Kang, C, Otsubo, S, Yumura, W, Mimori, A, Koike, T, Nakamura, Y, Sasazuki, T and Yamamoto, K, A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet.*, 2005. **37**(5): p. 478-85. Epub 2005 Apr 17.
- 58 Thabet, MM, Wesoly, J, Slagboom, PE, Toes, RE and Huizinga, TW, FCRL3 promoter 169 CC homozygosity is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in Dutch Caucasians. *Ann Rheum Dis.*, 2007. **66**(6): p. 803-6. Epub 2006 Dec 19.
- 59 Owen, CJ, Kelly, H, Eden, JA, Merriman, ME, Pearce, SH and Merriman, TR, Analysis of the Fc-Receptor Like-3 (Fcrl3) Locus in Caucasians with Autoimmune Disorders Suggests a Complex Pattern of Disease Association. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **2**: p. 2.
- 60 Beghe, B, Barton, S, Rorke, S, Peng, Q, Sayers, I, Gaunt, T, Keith, TP, Clough, JB, Holgate, ST and Holloway, JW, Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. *Clin Exp Allergy.*, 2003. **33**(8): p. 1111-7.

- 61 Martinez, A, Valdivia, A, Pascual-Salcedo, D, Balsa, A, Fernandez-Gutierrez, B, De la Concha, E and Urcelay, E, Role of SLC22A4, SLC22A5, and RUNX1 genes in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*, 2006. **33**(5): p. 842-6.
- 62 Tokuhito, S, Yamada, R, Chang, X, Suzuki, A, Kochi, Y, Sawada, T, Suzuki, M, Nagasaki, M, Ohtsuki, M, Ono, M, Furukawa, H, Nagashima, M, Yoshino, S, Mabuchi, A, Sekine, A, Saito, S, Takahashi, A, Tsunoda, T, Nakamura, Y and Yamamoto, K, An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 2003. **35**(4): p. 341-8.
- 63 Santiago, JL, Martinez, A, de la Calle, H, Fernandez-Arquero, M, Figueredo, MA, de la Concha, EG and Urcelay, E, Evidence for the association of the SLC22A4 and SLC22A5 genes with type 1 diabetes: a case control study. *BMC Med Genet.*, 2006. **7**: p. 54.
- 64 Peltekova, VD, Wintle, RF, Rubin, LA, Amos, CI, Huang, Q, Gu, X, Newman, B, Van Oene, M, Cescon, D, Greenberg, G, Griffiths, AM, St George-Hyslop, PH and Siminovitch, KA, Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet*, 2004. **36**(5): p. 471-5.
- 65 Rioux, JD, Daly, MJ, Silverberg, MS, Lindblad, K, Steinhart, H, Cohen, Z, Delmonte, T, Kocher, K, Miller, K, Guschwan, S, Kulbokas, EJ, O'Leary, S, Winchester, E, Dewar, K, Green, T, Stone, V, Chow, C, Cohen, A, Langelier, D, Lapointe, G, Gaudet, D, Faith, J, Branco, N, Bull, SB, McLeod, RS, Griffiths, AM, Bitton, A, Greenberg, GR, Lander, ES, Siminovitch, KA and Hudson, TJ, Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet.*, 2001. **29**(2): p. 223-8.

- 66 Vandenbroeck, K, Martino, G, Marrosu, M, Consiglio, A, Zaffaroni, M, Vaccargiu, S, Franciotta, D, Ruggeri, M, Comi, G and Grimaldi, LM, Occurrence and clinical relevance of an interleukin-4 gene polymorphism in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.*, 1997. **76**(1-2): p. 189-92.
- 67 Reboul, J, Mertens, C, Levillayer, F, Eichenbaum-Voline, S, Vilcoren, T, Cournu, I, Babron, MC, Lyon-Caen, O, Clerget-Darpoux, F, Edan, G, Clanet, M, Brahic, M, Bureau, JF, Fontaine, B and Liblau, R, Cytokines in genetic susceptibility to multiple sclerosis: a candidate gene approach. French Multiple Sclerosis Genetics Group. *J Neuroimmunol.*, 2000. **102**(1): p. 107-12.
- 68 Kantarci, OH, Schaefer-Klein, JL, Hebrink, DD, Achenbach, SJ, Atkinson, EJ, McMurray, CT and Weinshenker, BG, A population-based study of IL4 polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.*, 2003. **137**(1-2): p. 134-9.
- 69 He, B, Xu, C, Yang, B, Landtblom, AM, Fredrikson, S and Hillert, J, Linkage and association analysis of genes encoding cytokines and myelin proteins in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.*, 1998. **86**(1): p. 13-9.
- 70 McDonnell, GV, Kirk, CW, Hawkins, SA and Graham, CA, An evaluation of interleukin genes fails to identify clear susceptibility loci for multiple sclerosis. *J Neurol Sci.*, 2000. **176**(1): p. 4-12.
- 71 Shiau, MY, Huang, CN, Yang, TP, Hwang, YC, Tsai, KJ, Chi, CJ and Chang, YH, Cytokine promoter polymorphisms in Taiwanese patients with Graves' disease. *Clin Biochem.*, 2007. **40**(3-4): p. 213-7. Epub 2006 Dec 5.
- 72 Moreno, O, Gonzalez, CI, Saaibi, DL, Otero, W, Badillo, R, Martin, J and Ramirez, G, Polymorphisms in the IL4 and IL4RA genes in Colombian patients

- with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*, 2007. **34**(1): p. 36-42. Epub 2006 Nov 15.
- 73 Cantagrel, A, Navaux, F, Loubet-Lescoulie, P, Nourhashemi, F, Enault, G, Abbal, M, Constantin, A, Laroche, M and Mazieres, B, Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999. **42**(6): p. 1093-100.
- 74 Genevay, S, Di Giovine, FS, Perneger, TV, Silvestri, T, Stingelin, S, Duff, G and Guerne, PA, Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene variants with Larsen score progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2002. **47**(3): p. 303-9.
- 75 Eerligh, P, Koeleman, BP, Dudbridge, F, Jan Bruining, G, Roep, BO and Giphart, MJ, Functional genetic polymorphisms in cytokines and metabolic genes as additional genetic markers for susceptibility to develop type 1 diabetes. *Genes Immun.*, 2004. **5**(1): p. 36-40.
- 76 Kanemitsu, S, Takabayashi, A, Sasaki, Y, Kuromaru, R, Ihara, K, Kaku, Y, Sakai, K and Hara, T, Association of interleukin-4 receptor and interleukin-4 promoter gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 1999. **42**(6): p. 1298-300.
- 77 Skurkovich, S and Skurkovich, B, Anticytokine therapy, especially anti-interferon-gamma, as a pathogenetic treatment in TH-1 autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.*, 2005. **1051**: p. 684-700.
- 78 Schrijver, HM, Hooper-van Veen, T, van Belzen, MJ, Crusius, JB, Pena, AS, Barkhof, F, Polman, CH and Uitdehaag, BM, Polymorphisms in the genes

- encoding interferon-gamma and interferon-gamma receptors in multiple sclerosis. *Eur J Immunogenet.*, 2004. **31**(3): p. 133-40.
- 79 Leyva, L, Fernandez, O, Fedetz, M, Blanco, E, Fernandez, VE, Oliver, B, Leon, A, Pinto-Medel, MJ, Mayorga, C, Guerrero, M, Luque, G, Alcina, A and Matesanz, F, IFNAR1 and IFNAR2 polymorphisms confer susceptibility to multiple sclerosis but not to interferon-beta treatment response. *J Neuroimmunol*, 2005. **163**(1-2): p. 165-71. Epub 2005 Apr 22.
- 80 Kantarci, OH, Goris, A, Hebrink, DD, Heggarty, S, Cunningham, S, Alloza, I, Atkinson, EJ, de Andrade, M, McMurray, CT, Graham, CA, Hawkins, SA, Billiau, A, Dubois, B, Weinshenker, BG and Vandenbroeck, K, IFNG polymorphisms are associated with gender differences in susceptibility to multiple sclerosis. *Genes Immun.*, 2005. **6**(2): p. 153-61.
- 81 Rueda, B, Martinez, A, Lopez-Nevot, MA, Mas-Fontao, A, Paco, L, Ortega, E, Fernandez-Arquero, M, Urcelay, E, Gomez de la Concha, E and Martin, J, A functional variant of IFNgamma gene is associated with coeliac disease. *Genes Immun.*, 2004. **5**(6): p. 517-9.
- 82 Sodek, J, Ganss, B and McKee, MD, Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 2000. **11**(3): p. 279-303.
- 83 Chellaiah, MA, Kizer, N, Biswas, R, Alvarez, U, Strauss-Schoenberger, J, Rifas, L, Rittling, SR, Denhardt, DT and Hruska, KA, Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell.*, 2003. **14**(1): p. 173-89.
- 84 Ashkar, S, Weber, GF, Panoutsakopoulou, V, Sanchirico, ME, Jansson, M, Zawaideh, S, Rittling, SR, Denhardt, DT, Glimcher, MJ and Cantor, H, Eta-1

- (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science.*, 2000. **287**(5454): p. 860-4.
- 85 Weber, GF, Ashkar, S, Glimcher, MJ and Cantor, H, Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science.*, 1996. **271**(5248): p. 509-12.
- 86 Yokosaki, Y, Matsuura, N, Sasaki, T, Murakami, I, Schneider, H, Higashiyama, S, Saitoh, Y, Yamakido, M, Taooka, Y and Sheppard, D, The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem.*, 1999. **274**(51): p. 36328-34.
- 87 Jansson, M, Panoutsakopoulou, V, Baker, J, Klein, L and Cantor, H, Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol*, 2002. **168**(5): p. 2096-9.
- 88 Yamamoto, N, Sakai, F, Kon, S, Morimoto, J, Kimura, C, Yamazaki, H, Okazaki, I, Seki, N, Fujii, T and Uede, T, Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.*, 2003. **112**(2): p. 181-8.
- 89 Yumoto, K, Ishijima, M, Rittling, SR, Tsuji, K, Tsuchiya, Y, Kon, S, Nifuji, A, Uede, T, Denhardt, DT and Noda, M, Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2002. **99**(7): p. 4556-61.
- 90 Blom, T, Franzen, A, Heinegard, D and Holmdahl, R, Comment on "The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease". *Science.*, 2003. **299**(5614): p. 1845; author reply .
- 91 Bloom, BR and Bennett, B, Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science.*, 1966. **153**(731): p. 80-2.

- 92 Paralkar, V and Wistow, G, Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Genomics.*, 1994. **19**(1): p. 48-51.
- 93 Nishino, T, Bernhagen, J, Shiiki, H, Calandra, T, Dohi, K and Bucala, R, Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol Med.*, 1995. **1**(7): p. 781-8.
- 94 Calandra, T, Bernhagen, J, Metz, CN, Spiegel, LA, Bacher, M, Donnelly, T, Cerami, A and Bucala, R, MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.*, 1995. **377**(6544): p. 68-71.
- 95 Alourfi, Z, Donn, RP, Stevens, A, Berry, A, McMaster, A and Ray, DW, Glucocorticoids suppress macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in a cell-type-specific manner. *J Mol Endocrinol.*, 2005. **34**(2): p. 583-95.
- 96 Denking, CM, Denking, M, Kort, JJ, Metz, C and Forsthuber, TG, In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by impairing the homing of encephalitogenic T cells to the central nervous system. *J Immunol.*, 2003. **170**(3): p. 1274-82.
- 97 Niino, M, Ogata, A, Kikuchi, S, Tashiro, K and Nishihira, J, Macrophage migration inhibitory factor in the cerebrospinal fluid of patients with conventional and optic-spinal forms of multiple sclerosis and neuro-Behcet's disease. *J Neurol Sci.*, 2000. **179**(S 1-2): p. 127-31.
- 98 de Jong, YP, Abadia-Molina, AC, Satoskar, AR, Clarke, K, Rietdijk, ST, Faubion, WA, Mizoguchi, E, Metz, CN, Alsahli, M, ten Hove, T, Keates, AC, Lubetsky, JB, Farrell, RJ, Michetti, P, van Deventer, SJ, Lolis, E, David, JR,

- Bhan, AK and Terhorst, C, Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol.*, 2001. **2**(11): p. 1061-6.
- 99 Morand, EF, Leech, M, Weedon, H, Metz, C, Bucala, R and Smith, MD, Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: clinical correlations. *Rheumatology (Oxford)*. 2002. **41**(5): p. 558-62.
- 100 Sakai, Y, Masamune, A, Satoh, A, Nishihira, J, Yamagiwa, T and Shimosegawa, T, Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology.*, 2003. **124**(3): p. 725-36.
- 101 Donn, R, Alourfi, Z, De Benedetti, F, Meazza, C, Zeggini, E, Lunt, M, Stevens, A, Shelley, E, Lamb, R, Ollier, WE, Thomson, W and Ray, D, Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2002. **46**(9): p. 2402-9.
- 102 Amoli, MM, Donn, RP, Thomson, W, Hajeer, AH, Garcia-Porrúa, C, Lueiro, M, Ollier, WE and Gonzalez-Gay, MA, Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with sarcoidosis in biopsy proven erythema nodosum. *J Rheumatol.*, 2002. **29**(8): p. 1671-3.
- 103 Hizawa, N, Yamaguchi, E, Takahashi, D, Nishihira, J and Nishimura, M, Functional polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor and atopy. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2004. **169**(9): p. 1014-8. Epub 2004 Feb 12.
- 104 Nohara, H, Okayama, N, Inoue, N, Koike, Y, Fujimura, K, Suehiro, Y, Hamanaka, Y, Higaki, S, Yanai, H, Yoshida, T, Hibi, T, Okita, K and Hinoda, Y, Association of the -173 G/C polymorphism of the macrophage migration

- inhibitory factor gene with ulcerative colitis. *J Gastroenterol.*, 2004. **39**(3): p. 242-6.
- 105 Bogdan, C, Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.*, 2001. **2**(10): p. 907-16.
- 106 Sherman, MP, Griscavage, JM and Ignarro, LJ, Nitric oxide-mediated neuronal injury in multiple sclerosis. *Med Hypotheses*, 1992. **39**(2): p. 143-6.
- 107 Smith, KJ and Lassmann, H, The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.*, 2002. **1**(4): p. 232-41.
- 108 Abu-Soud, HM, Loftus, M and Stuehr, DJ, Subunit dissociation and unfolding of macrophage NO synthase: relationship between enzyme structure, prosthetic group binding, and catalytic function. *Biochemistry*, 1995. **34**(35): p. 11167-75.
- 109 Modin, H, Dai, Y, Masterman, T, Svejgaard, A, Sorensen, PS, Oturai, A, Ryder, LP, Spurkland, A, Vartdal, F, Laaksonen, M, Sandberg-Wollheim, M, Myhr, KM, Nyland, H and Hillert, J, No linkage or association of the nitric oxide synthase genes to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.*, 2001. **119**(1): p. 95-100.
- 110 Blanco, Y, Yague, J, Graus, F and Saiz, A, No association of inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) to multiple sclerosis. *J Neurol.*, 2003. **250**(5): p. 598-600.
- 111 Barcellos, LF, Begovich, AB, Reynolds, RL, Caillier, SJ, Brassat, D, Schmidt, S, Grams, SE, Walker, K, Steiner, LL, Cree, BA, Stillman, A, Lincoln, RR, Pericak-Vance, MA, Haines, JL, Erlich, HA, Hauser, SL and Oksenberg, JR, Linkage and association with the NOS2A locus on chromosome 17q11 in multiple sclerosis. *Ann Neurol.*, 2004. **55**(6): p. 793-800.
- 112 Tajouri, L, Martin, V, Ovcaric, M, Curtain, RP, Lea, RA, Csurhes, P, Pender, MP and Griffiths, LR, Investigation of an inducible nitric oxide synthase gene

- (NOS2A) polymorphism in a multiple sclerosis population. *Brain Res Bull.*, 2004. **64**(1): p. 9-13.
- 113 Bugeja, MJ, Booth, DR, Bennetts, BH, Heard, RN, Burgner, D and Stewart, GJ, An investigation of NOS2A promoter polymorphisms in Australian multiple sclerosis patients. *Eur J Hum Genet.*, 2005. **13**(7): p. 815-22.
- 114 Johannesen, J, Pie, A, Pociot, F, Kristiansen, OP, Karlsen, AE and Nerup, J, Linkage of the human inducible nitric oxide synthase gene to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2001. **86**(6): p. 2792-6.
- 115 Morris, BJ, Markus, A, Glenn, CL, Adams, DJ, Colagiuri, S and Wang, L, Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes. *J Mol Med.*, 2002. **80**(2): p. 96-104. Epub 2001 Oct 5.
- 116 Warpeha, KM, Xu, W, Liu, L, Charles, IG, Patterson, CC, Ah-Fat, F, Harding, S, Hart, PM, Chakravarthy, U and Hughes, AE, Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)(n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *Faseb J.*, 1999. **13**(13): p. 1825-32.
- 117 Tatemichi, M, Sawa, T, Gilibert, I, Tazawa, H, Katoh, T and Ohshima, H, Increased risk of intestinal type of gastric adenocarcinoma in Japanese women associated with long forms of CCTTT pentanucleotide repeat in the inducible nitric oxide synthase promoter. *Cancer Lett.*, 2005. **217**(2): p. 197-202.
- 118 Rueda, B, Lopez-Nevot, MA, Pascual, M, Ortega, E, Maldonado, J, Lopez, ML, Koeleman, BP and Martin, J, Polymorphism of the inducible nitric oxide synthase gene in celiac disease. *Hum Immunol*, 2002. **63**(11): p. 1062-65.

-
- 119 Kolios, G, Valatas, V and Ward, SG, Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology.*, 2004. **113**(4): p. 427-37.
- 120 Singer, II, Kawka, DW, Scott, S, Weidner, JR, Mumford, RA, Riehl, TE and Stenson, WF, Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.*, 1996. **111**(4): p. 871-85.
- 121 Godkin, AJ, De Belder, AJ, Villa, L, Wong, A, Beesley, JE, Kane, SP and Martin, JF, Expression of nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest.*, 1996. **26**(10): p. 867-72.
- 122 Oliver, J, Gomez-Garcia, M, Vilchez, JR, Lopez-Nevot, MA, Pinero, A, Corroero, F, Nieto, A and Martin, J, Inducible and endothelial nitric oxide synthase genes polymorphism in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens*, 2006. **67**(4): p. 326-30.
- 123 Sakurai, H, Kohsaka, H, Liu, MF, Higashiyama, H, Hirata, Y, Kanno, K, Saito, I and Miyasaka, N, Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest.*, 1995. **96**(5): p. 2357-63.
- 124 Miller, SA, Dykes, DD and Polesky, HF, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 1988. **16**(3): p. 1215.
- 125 Kimura, A and Sasazuki, T, Eleventh International Histocompatibility workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. *HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference*, 1991. **1**: p. 397-419.

- 126 Tremmel, M, Opelz, G and Mytilineos, J, High-resolution typing for HLA-DRB1*15 and -DRB1*16 by fluorescence-marked sequence-specific priming (TaqMan assay). *Tissue Antigens.*, 1999. **54**(5): p. 508-16.
- 127 Hymas, W, Stevenson, J, Taggart, EW and Hillyard, D, Use of lyophilized standards for the calibration of a newly developed real time PCR assay for human herpes type six (HHV6) variants A and B. *J Virol Methods*, 2005. **128**(1-2): p. 143-50.
- 128 Urcelay, E, Martinez, A, Mas-Fontao, A, Peris-Pertusa, A, Pascual-Salcedo, D, Balsa, A, Fernandez-Arquero, M and de la Concha, E, Osteopontin gene polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2005. **32**(3): p. 405-9.
- 129 Akkad, DA, Jagiello, P, Szyld, P, Goedde, R, Wieczorek, S, Gross, WL and Epplen, JT, Promoter polymorphism rs3087456 in the MHC class II transactivator gene is not associated with susceptibility for selected autoimmune diseases in German patient groups. *Int J Immunogenet.*, 2006. **33**(1): p. 59-61.
- 130 Ghaderi, M, Gambelunghe, G, Tortoioli, C, Brozzetti, A, Jatta, K, Gharizadeh, B, De Bellis, A, Pecori Giraldi, F, Terzolo, M, Betterle, C and Falorni, A, MHC2TA single nucleotide polymorphism and genetic risk for autoimmune adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2006. **91**(10): p. 4107-11. Epub 2006 Jul 18.
- 131 Koizumi, K, Okamoto, H, Iikuni, N, Nakamura, T, Kawamoto, M, Momohara, S, Ichikawa, N, Furuya, T, Kotake, S, Taniguchi, A, Yamanaka, H and Kamatani, N, Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding the major histocompatibility complex class II transactivator (CIITA) in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.*, 2005. **64**(6): p. 947-50.

- 132 Yazdani-Biuki, B, Brickmann, K, Wohlfahrt, K, Mueller, T, Marz, W, Renner, W, Gutjahr, M, Langsenlehner, U, Krippel, P, Wascher, TC, Paulweber, B, Graninger, W and Brezinschek, HP, The MHC2TA -168A>G gene polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis in Austrian patients. *Arthritis Res Ther.*, 2006. **8**(4): p. R97.
- 133 Neumann, H, Misgeld, T, Matsumuro, K and Wekerle, H, Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1998. **95**(10): p. 5779-84.
- 134 Wekerle, H, Sun, D, Oropenza-Wekerle, RL and Meyermann, R, Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol.*, 1987. **132**: p. 43-57.
- 135 Bo, L, Mork, S, Kong, PA, Nyland, H, Pardo, CA and Trapp, BD, Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol.*, 1994. **51**(2): p. 135-46.
- 136 Zeinstra, E, Wilczak, N, Streefland, C and De Keyser, J, Astrocytes in chronic active multiple sclerosis plaques express MHC class II molecules. *Neuroreport.*, 2000. **11**(1): p. 89-91.
- 137 Rasmussen, HB, Kelly, MA and Clausen, J, Genetic susceptibility to multiple sclerosis: detection of polymorphic nucleotides and an intron in the 3' untranslated region of the major histocompatibility complex class II transactivator gene. *Hum Immunol*, 2001. **62**(4): p. 371-7.
- 138 Stuve, O, Youssef, S, Slavin, AJ, King, CL, Patarroyo, JC, Hirschberg, DL, Brickey, WJ, Soos, JM, Piskurich, JF, Chapman, HA and Zamvil, SS, The role of the MHC class II transactivator in class II expression and antigen presentation

- by astrocytes and in susceptibility to central nervous system autoimmune disease. *J Immunol.*, 2002. **169**(12): p. 6720-32.
- 139 Tompkins, SM, Padilla, J, Dal Canto, MC, Ting, JP, Van Kaer, L and Miller, SD, De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.*, 2002. **168**(8): p. 4173-83.
- 140 Linga-Reddy, MV, Gunnarsson, I, Svenungsson, E, Sturfelt, G, Jonsen, A, Truedsson, L, Nordmark, G, Ronnblom, L and Alarcon-Riquelme, ME, A polymorphic variant in the MHC2TA gene is not associated with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, 2007.
- 141 Van Bodegraven, AA, Curley, CR, Hunt, KA, Monsuur, AJ, Linskens, RK, Onnie, CM, Crusius, JB, Annese, V, Latiano, A, Silverberg, MS, Bitton, A, Fisher, SA, Steinhart, AH, Forbes, A, Sanderson, J, Prescott, NJ, Strachan, DP, Playford, RJ, Mathew, CG, Wijmenga, C, Daly, MJ, Rioux, JD and Van Heel, DA, Genetic Variation in Myosin IXB Is Associated With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 2006.
- 142 Conrad, DF, Andrews, TD, Carter, NP, Hurles, ME and Pritchard, JK, A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet*, 2006. **38**(1): p. 75-81.
- 143 Hinds, DA, Klok, AP, Jen, M, Chen, X and Frazer, KA, Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet*, 2006. **38**(1): p. 82-5.
- 144 Kenealy, SJ, Babron, MC, Bradford, Y, Schnetz-Boutaud, N, Haines, JL, Rimmler, JB, Schmidt, S, Pericak-Vance, MA, Barcellos, LF, Lincoln, RR, Oksenberg, JR, Hauser, SL, Clanet, M, Brassat, D, Edan, G, Yaouanq, J,

- Semana, G, Cournu-Rebeix, I, Lyon-Caen, O and Fontaine, B, A second-generation genomic screen for multiple sclerosis. *Am J Hum Genet*, 2004. **75**(6): p. 1070-8.
- 145 Sawcer, S, Ban, M, Maranian, M, Yeo, TW, Compston, A, Kirby, A, Daly, MJ, De Jager, PL, Walsh, E, Lander, ES, Rioux, JD, Hafler, DA, Ivinson, A, Rimmler, J, Gregory, SG, Schmidt, S, Pericak-Vance, MA, Akesson, E, Hillert, J, Datta, P, Oturai, A, Ryder, LP, Harbo, HF, Spurkland, A, Myhr, KM, Laaksonen, M, Booth, D, Heard, R, Stewart, G, Lincoln, R, Barcellos, LF, Hauser, SL, Oksenberg, JR, Kenealy, SJ and Haines, JL, A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet*, 2005. **77**(3): p. 454-67.
- 146 Serrano-Fernandez, P, Ibrahim, SM, Zettl, UK, Thiesen, HJ, Godde, R, Epplen, JT and Moller, S, Intergenomic consensus in multifactorial inheritance loci: the case of multiple sclerosis. *Genes Immun*, 2004. **5**(8): p. 615-20.
- 147 Mansson, R, Tsapogas, P, Akerlund, M, Lagergren, A, Gisler, R and Sigvardsson, M, Pearson correlation analysis of microarray data allows for the identification of genetic targets for early B-cell factor. *J Biol Chem*, 2004. **279**(17): p. 17905-13.
- 148 Maimone, D, Guazzi, GC and Annunziata, P, IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci*, 1997. **146**(1): p. 59-65.
- 149 Navikas, V, Matusevicius, D, Soderstrom, M, Fredrikson, S, Kivisakk, P, Ljungdahl, A, Hojeberg, B and Link, H, Increased interleukin-6 mRNA expression in blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 1996. **64**(1): p. 63-9.

- 150 Okuda, Y, Sakoda, S, Saeki, Y, Kishimoto, T and Yanagihara, T, Enhancement of Th2 response in IL-6-deficient mice immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neuroimmunol*, 2000. **105**(2): p. 120-3.
- 151 Lee, VM, Goedert, M and Trojanowski, JQ, Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*, 2001. **24**: p. 1121-59.
- 152 Ebner, A, Godemann, R, Stamer, K, Illenberger, S, Trinczek, B and Mandelkow, E, Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol*, 1998. **143**(3): p. 777-94.
- 153 Kapaki, E, Paraskevas, GP, Michalopoulou, M and Kilidireas, K, Increased cerebrospinal fluid tau protein in multiple sclerosis. *Eur Neurol*, 2000. **43**(4): p. 228-32.
- 154 Schneider, A, Araujo, GW, Trajkovic, K, Herrmann, MM, Merkler, D, Mandelkow, EM, Weissert, R and Simons, M, Hyperphosphorylation and aggregation of tau in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem*, 2004. **279**(53): p. 55833-9.
- 155 Ghayor, C, Herrouin, JF, Chadjichristos, C, Ala-Kokko, L, Takigawa, M, Pujol, JP and Galera, P, Regulation of human COL2A1 gene expression in chondrocytes. Identification of C-Krox-responsive elements and modulation by phenotype alteration. *J Biol Chem*, 2000. **275**(35): p. 27421-38.
- 156 Ozaki, K, Ohnishi, Y, Iida, A, Sekine, A, Yamada, R, Tsunoda, T, Sato, H, Sato, H, Hori, M, Nakamura, Y and Tanaka, T, Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*, 2002. **32**(4): p. 650-4.

- 157 Surinya, KH, Cox, TC and May, BK, Identification and characterization of a conserved erythroid-specific enhancer located in intron 8 of the human 5-aminolevulinate synthase 2 gene. *J Biol Chem*, 1998. **273**(27): p. 16798-809.
- 158 Villar, LM, Sadaba, MC, Roldan, E, Masjuan, J, Gonzalez-Porque, P, Villarrubia, N, Espino, M, Garcia-Trujillo, JA, Bootello, A and Alvarez-Cermenio, JC, Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest*, 2005. **115**(1): p. 187-94.
- 159 Sellebjerg, F, Christiansen, M, Nielsen, PM and Frederiksen, JL, Cerebrospinal fluid measures of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*, 1998. **4**(6): p. 475-9.
- 160 Ikari, K, Momohara, S, Nakamura, T, Hara, M, Yamanaka, H, Tomatsu, T and Kamatani, N, Supportive evidence for a genetic association of the FCRL3 promoter polymorphism with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2006. **65**(5): p. 671-3. Epub 2005 Sep 21.
- 161 Thabet, MM, Wesoly, J, Slagboom, PE, Toes, RE and Huizinga, TW, FCRL3 promoter 169 CC homozygosity is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in Dutch Caucasians. *Ann Rheum Dis*, 2006. **19**: p. 19.
- 162 Choi, CB, Kang, CP, Seong, SS, Bae, SC and Kang, C, The -169C/T polymorphism in FCRL3 is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus in a case-control study of Koreans. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(12): p. 3838-41.
- 163 Hu, X, Chang, M, Saiki, RK, Cargill, MA, Begovich, AB, Ardlie, KG, Criswell, LA, Seldin, MF, Amos, CI, Gregersen, PK, Kastner, DL and Remmers, EF, The functional -169T-->C single-nucleotide polymorphism in FCRL3 is not

- associated with rheumatoid arthritis in white North Americans. *Arthritis Rheum.*, 2006. **54**(3): p. 1022-5.
- 164 Martinez, A, Sanchez, E, Valdivia, A, Orozco, G, Lopez-Nevot, MA, Pascual-Salcedo, D, Balsa, A, Fernandez-Gutierrez, B, de la Concha, EG, Garcia-Sanchez, A, Koeleman, BP, Urcelay, E and Martin, J, Epistatic interaction between FCRL3 and NFkappaB1 genes in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 2006. **65**(9): p. 1188-91. Epub 2006 Feb 13.
- 165 Newman, WG, Zhang, Q, Liu, X, Walker, E, Ternan, H, Owen, J, Johnson, B, Greer, W, Mosher, DP, Maksymowych, WP, Bykerk, VP, Keystone, EC, Amos, CI and Siminovitch, KA, Rheumatoid arthritis association with the FCRL3 - 169C polymorphism is restricted to PTPN22 1858T-homozygous individuals in a Canadian population. *Arthritis Rheum.*, 2006. **54**(12): p. 3820-7.
- 166 Urich, E, Gutcher, I, Prinz, M and Becher, B, Autoantibody-mediated demyelination depends on complement activation but not activatory Fc-receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2006. **103**(49): p. 18697-702. Epub 2006 Nov 22.
- 167 Abdul-Majid, KB, Stefferl, A, Bourquin, C, Lassmann, H, Linington, C, Olsson, T, Kleinau, S and Harris, RA, Fc receptors are critical for autoimmune inflammatory damage to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol.*, 2002. **55**(1): p. 70-81.
- 168 Lock, C, Hermans, G, Pedotti, R, Brendolan, A, Schadt, E, Garren, H, Langer-Gould, A, Strober, S, Cannella, B, Allard, J, Klonowski, P, Austin, A, Lad, N, Kaminski, N, Galli, SJ, Oksenberg, JR, Raine, CS, Heller, R and Steinman, L, Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.*, 2002. **8**(5): p. 500-8.

- 169 Myhr, KM, Raknes, G, Nyland, H and Vedeler, C, Immunoglobulin G Fc-receptor (FcgammaR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS. *Neurology.*, 1999. **52**(9): p. 1771-6.
- 170 Breij, EC, van der Pol, WL, van Winsen, L, Jansen, MD, Dijkstra, CD, van de Winkel, JG and Uitdehaag, BM, No association of Fc gamma RIIa, Fc gamma RIIIa and Fc gamma RIIb polymorphisms with MS. *J Neuroimmunol.*, 2003. **140**(1-2): p. 210-5.
- 171 Simmonds, MJ, Heward, JM, Carr-Smith, J, Foxall, H, Franklyn, JA and Gough, SC, Contribution of single nucleotide polymorphisms within FCRL3 and MAP3K7IP2 to the pathogenesis of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2006. **91**(3): p. 1056-61. Epub 2005 Dec 29.
- 172 Martinez Doncel, A, Rubio, A, Arroyo, R, de las Heras, V, Martin, C, Fernandez-Arquero, M and de la Concha, EG, Interleukin-10 polymorphisms in Spanish multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.*, 2002. **131**(1-2): p. 168-72.
- 173 Hunt, PJ, Marshall, SE, Weetman, AP, Bell, JI, Wass, JA and Welsh, KI, Cytokine gene polymorphisms in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2000. **85**(5): p. 1984-8.
- 174 Aithal, GP, Day, CP, Leathart, J, Daly, AK and Hudson, M, Association of single nucleotide polymorphisms in the interleukin-4 gene and interleukin-4 receptor gene with Crohn's disease in a British population. *Genes Immun.*, 2001. **2**(1): p. 44-7.
- 175 Bugawan, TL, Mirel, DB, Valdes, AM, Panelo, A, Pozzilli, P and Erlich, HA, Association and interaction of the IL4R, IL4, and IL13 loci with type 1 diabetes among Filipinos. *Am J Hum Genet.*, 2003. **72**(6): p. 1505-14. Epub 2003 May 13.

- 176 de Jong, BA, Westendorp, RG, Eskdale, J, Uitdehaag, BM and Huizinga, TW, Frequency of functional interleukin-10 promoter polymorphism is different between relapse-onset and primary progressive multiple sclerosis. *Hum Immunol.*, 2002. **63**(4): p. 281-5.
- 177 Kamali-Sarvestani, E, Nikseresht, A, Aflaki, E, Sarvari, J and Ghareisi-Fard, B, TNF-alpha, TNF-beta and IL-4 gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.*, 2007. **115**(3): p. 161-6.
- 178 Urcelay, E, Santiago, JL, Mas, A, Martinez, A, de Las Heras, V, Arroyo, R and de la Concha, EG, Role of interleukin 4 in Spanish multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.*, 2005. **168**(1-2): p. 164-7.
- 179 Daly, AK and Day, CP, Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. *Br J Clin Pharmacol.*, 2001. **52**(5): p. 489-99.
- 180 Martinez, A, Martin, MC, Mendoza, JL, Taxonera, C, Diaz-Rubio, M, de la Concha, EG and Urcelay, E, Association of the organic cation transporter OCTN genes with Crohn's disease in the Spanish population. *Eur J Hum Genet.*, 2006. **14**(2): p. 222-6.
- 181 Pravica, V, Asderakis, A, Perrey, C, Hajeer, A, Sinnott, PJ and Hutchinson, IV, In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet*, 1999. **26**(1): p. 1-3.
- 182 Pravica, V, Perrey, C, Stevens, A, Lee, JH and Hutchinson, IV, A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol*, 2000. **61**(9): p. 863-6.
- 183 Sriram, U, Barcellos, LF, Villoslada, P, Rio, J, Baranzini, SE, Caillier, S, Stillman, A, Hauser, SL, Montalban, X and Oksenberg, JR, Pharmacogenomic

- analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes Immun*, 2003. **4**(2): p. 147-52.
- 184 Chiocchetti, A, Comi, C, Indelicato, M, Castelli, L, Mesturini, R, Bensi, T, Mazzarino, MC, Giordano, M, D'Alfonso, S, Momigliano-Richiardi, P, Liguori, M, Zorzon, M, Amoroso, A, Trojano, M, Monaco, F, Leone, M, Magnani, C and Dianzani, U, Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol*, 2005. **163**(1-2): p. 172-8.
- 185 Hensiek, AE, Roxburgh, R, Meranian, M, Seaman, S, Yeo, T, Compston, DA and Sawcer, SJ, Osteopontin gene and clinical severity of multiple sclerosis. *J Neurol*, 2003. **250**(8): p. 943-7.
- 186 Niino, M, Kikuchi, S, Fukazawa, T, Yabe, I and Tashiro, K, Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol*, 2003. **136**(1-2): p. 125-9.
- 187 Donn, RP, Shelley, E, Ollier, WE and Thomson, W, A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2001. **44**(8): p. 1782-5.
- 188 Mitterski, B, Drynda, S, Boschow, G, Klein, W, Oppermann, J, Kekow, J and Epplen, JT, Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genet.*, 2004. **5**: p. 2.
- 189 Nunez, C, Rueda, B, Martinez, A, Lopez-Nevot, MA, Fernandez-Arquero, M, de la Concha, EG, Martin, J and Urcelay, E, Involvement of macrophage migration inhibitory factor gene in celiac disease susceptibility. *Genes Immun*, 2007. **11**: p. 11.

- 190 Sanchez, E, Gomez, LM, Lopez-Nevot, MA, Gonzalez-Gay, MA, Sabio, JM, Ortego-Centeno, N, de Ramon, E, Anaya, JM, Gonzalez-Escribano, MF, Koeleman, BP and Martin, J, Evidence of association of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.*, 2006. **7**(5): p. 433-6. Epub 2006 May 18.
- 191 Gonzalez-Rey, E and Delgado, M, Therapeutic treatment of experimental colitis with regulatory dendritic cells generated with vasoactive intestinal peptide. *Gastroenterology.*, 2006. **131**(6): p. 1799-811. Epub 2006 Oct 15.
- 192 Fernandez-Martin, A, Gonzalez-Rey, E, Chorny, A, Martin, J, Pozo, D, Ganea, D and Delgado, M, VIP prevents experimental multiple sclerosis by downregulating both inflammatory and autoimmune components of the disease. *Ann N Y Acad Sci.*, 2006. **1070**: p. 276-81.
- 193 Burgner, D, Rockett, K, Ackerman, H, Hull, J, Usen, S, Pinder, M and Kwiatkowski, DP, Haplotypic relationship between SNP and microsatellite markers at the NOS2A locus in two populations. *Genes Immun*, 2003. **4**(7): p. 506-14.